

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Avaliação do comportamento dos
osteoclastos em doenças reumáticas**

Inês Pedro Perpétuo

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Avaliação do comportamento dos
osteoclastos em doenças reumáticas**

Tese de Mestrado orientada por
Professora Doutora Helena Canhão - Unidade de Investigação em Reumatologia do
Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina e Serviço de Reumatologia e
doenças ósseas metabólicas do Hospital de Santa Maria
Professora Doutora Margarida Telhada – Departamento de Química e Bioquímica da
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Inês Pedro Perpétuo

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2009

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor João Eurico por me ter aceite como estudante de mestrado e por me ter apoiado em diversas circunstâncias principalmente nas menos boas. Obrigada também por me ter dado tantos “toques” quantos os que foram precisos para eu assentar ideias.

Quero agradecer à minha orientadora Professora Helena Canhão por me ter dado na cabeça sempre que precisei de andar a toque de caixa, por me ter orientado e também desorientado na hora H. Por todo o trabalho conjunto que fizemos e por estar sempre lá quando eu precisei...

Um profundo agradecimento também à Professora Margarida Telhada por me ter feito entender que não podemos desistir nunca por mais negras que as coisas estejam, por me ter dito o que eu precisava de ouvir na altura certa e porque “pode sempre fazer ciência sem fazer investigação”.

Quero agradecer também às minhas colegas e amigas Joana Lopes e Ana Maria Rodrigues. À Joana por todos os serões no Colombo a planear experiências, a discutir projectos, as idas ao cinema, pelas ideias genuínas que originaram um grande projecto e trabalho de mestrado e acima de tudo por me aturar as “birras” laboratoriais (e sim, eu também te aturei muitas). À Ana Maria por todas as vezes que me disse “não podes dizer que se deve à terapêutica!!!”, por ser tão presente no laboratório como no hospital, por ter também muitas e boas ideias e acima de tudo por me ajudar no brainstorming.

A grande equipa do laboratório não pode ser esquecida... Às amigas que já não trabalham comigo: Inês, Lurdes, Íris, Catarina e Patrícia. Aos amigos do IMM que estarão sempre lá para nós: Bruno (por seres um galo no meio das galinhas), Inês (por furares as cabeças e por me tirares do sério), Diana (porque tu sabes que amigos recentes podem ser os melhores amigos), Rita M (longe mas sempre perto), Rita C (porque há certas horas inesquecíveis), ao Joaquim (porque há processos infindáveis de doentes), à Filipa (por todos os momentos de “rompante” no gabinete), à Elsa (porque as minhas amígdalas não gostam de ti) e a todos os outros colegas, amigos e afins que me esqueci...

Queria agradecer também a muitas outras pessoas fora do laboratório que nestes anos (tal como todos os outros, nunca terem desistido de mim...).

À São, à Mafalda e às minhas Irmãs de perto e longe... Porque seremos sempre Filhas da Lua.

Um grande abraço e beijo gigante e um MEGA OBRIGADA às minhas Crubélias: Inês (porque as Gêmeas estarão sempre juntas), Germana (porque falas alto e ris como eu), Marta (por sermos tão diferentes e tão iguais) e Catarina (por todos os animes que trocamos e todos os emails parvos).

Um Mega obrigada também à Laura e Susana porque as amigas da Faculdade não são só as do mesmo ramo que nós...

Queria ainda agradecer às Professoras Rita Zilhão, Graça Vieira e Gabriela Rodrigues que sempre tiveram um tempo para mim, para me ouvir e para me aconselhar.

Um muito obrigada a todos os livros que me acompanharam durante esta tese, e não, não falo de livros de estudo mas sim de livros fantásticos de aventura: um obrigada ao Rafael e a toda a equipa Nocturnus por me fazerem acreditar que se quisermos, tudo é possível.

Obrigada à Música que tanto me acompanhou por todo o lado, porque o Metal é um estilo de vida e não apenas uma música, muito obrigada a todas as bandas e a todos os bares e festivais, por me terem ajudado a suportar horas infindáveis de pesquisa e escrita.

Um muito obrigada também aos homens da minha vida... Nunca lerão isto e também não escrevo para ninguém em particular... Porque na nossa vida nunca estamos sozinhos e precisamos de alguém ao nosso lado...

Finalmente queria agradecer aos que tornaram isto possível... Aos meus pais! Por todo o apoio nas horas más, por todas as vezes que aturaram os meus maus humores, por todas as situações que vivemos e ultrapassámos juntos... ao meu pai por ser importante distinguir trabalho e lazer (ou não ;)) e à minha mãe, por ser o exemplo de coragem e força de vontade que sempre seguirei!

Obrigada a todos...

“Although we have finished the Song, we’ll never finish the Journey”

Bruce Dickinson, Iron Maiden

Lista de Abreviaturas

ACR - <i>American College of Rheumatology</i>	MCP – <i>Monocyte chemotactic protein</i>
AR – Artrite Reumatóide	M-CSF – <i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
ATP – <i>Adenosine-5'-triphosphate</i> – Adenosina tri-fosfato	Mip – <i>Macrophage inflammatory protein</i>
BLAST - <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	MMP – <i>Matrix metalloproteinase</i> – Metaloproteinase de matriz
CD – <i>Cluster of Differentiation</i>	MTX – <i>Methotrexate</i> - Metotrexato
cDNA – <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico complementar	OA - Osteoartrose
CTSK –Catepsina K	OB - Osteoblasto
DAS – <i>Disease Activity Score</i>	OC - Osteoclasto
DC-STAMP – <i>Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein</i>	OPG – <i>Osteoprotegerin</i> - Osteoprotegerina
DMEM - <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	PBS – <i>Phosphate Buffered Saline</i>
DNA - <i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico	PCR – <i>Polymerase Chain Reaction</i>
EDTA – <i>Ethylenediamine tetraacetic Acid</i>	PE – Phycoerythrin
ELISA - <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	qPCR – <i>quantitative PCR</i>
FBS – <i>Fetal Bovine Serum</i>	RANK – <i>Receptor Activator of Nuclear Factor κB</i>
FACS - <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	RANKL - <i>Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand</i>
FITC – <i>Fluorescein isothiocyanate</i>	RIN – <i>RNA Integrity Number</i>
GM-CSF – <i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>	RNA – <i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido ribonucleico
i.m.f. – intensidade media de fluorescência	RT-PCR - <i>Real Time-Polymerase Chain Reaction</i>
IL – <i>Interleukin</i> - Interleucina	TACE – <i>TNF-α converting enzyme</i>
IFN – <i>Interferon</i> - Interferão	TGF – <i>Transforming Growth Factor</i>
	TNF – <i>Tumor Necrosis Factor</i>
	TRAP – <i>Tartrate Resistant Acid Phosphatase</i>

Índice

Agradecimentos	1
Índice	4
1. Resumo	5
2. Abstract	6
3. Introdução.....	7
4. Material e métodos	12
4.1 - População em estudo.....	12
4.2 – Doseamento de citocinas	12
4.3 – Isolamento de monócitos de sangue periférico	13
4.4 – Cultura de osteoclastos.....	13
4.5– Ensaio funcionais.....	14
4.5.1 – Marcação de TRAP	14
4.5.2 – Ensaio de reabsorção	14
4.6 – Expressão génica	14
4.6.1 – Extracção de RNA.....	14
4.6.2 – Síntese de cDNA	15
4.6.3 – Curvas-padrão	15
4.6.4 – Quantificação da expressão génica	16
4.7 – Frequência de células $\alpha_v\beta_3^+$	16
4.8 - Análise estatística.....	16
5. Resultados	17
5.1 – Características da amostra	17
5.2 – Doseamento de citocinas	17
5.2.1 – Doseamento de citocinas no soro	17
5.2.2 – Doseamento de citocinas no líquido sinovial	20
5.3 – Avaliação da diferenciação de monócitos em osteoclastos.....	23
5.3.1 – Curvas-padrão	23
5.3.2 – <i>Tartrate resistant acid phosphatase</i> (TRAP)	23
5.3.3 – Integrina $\alpha_v\beta_3$	25
5.3.4 – Catepsina K	27
6. Discussão	29
7. Bibliografia	38
Anexos	40
Quantificação de proteínas através do <i>FlowCytomix</i> TM	40
Características dos primers e RT-PCR.....	41
Quantificação génica pelo método da recta padrão.....	42
Qualidade e integridade do RNA	43

1. Resumo

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistémica que afecta particularmente as articulações, destruindo-as. Nesta patologia ocorre uma hiper-activação do sistema imunitário que não só conduz a inflamação crónica como estimula a reabsorção óssea por activação dos osteoclastos (OC). Estudos recentes mostraram que citocinas como a interleucina (IL)-1, IL-6 e o factor de necrose tumoral (TNF) para além de terem um papel fundamental na inflamação também estimulam a activação dos OC. Recentemente foram desenvolvidas novas terapêuticas para bloquear especificamente elementos chave desta doença como o TNF (anti-TNF) e a IL-6 (anti-receptor da IL-6, tocilizumab), as chamadas terapêuticas biológicas. Contudo não se conhece ainda o efeito exacto destas novas terapêuticas no osso humano.

Nesse sentido, em doentes com AR sob diferentes terapêuticas (corticóides, metotrexato, anti-TNF e tocilizumab) foi estudado o ambiente inflamatório sistémico e local (na articulação) e a partir de precursores circulantes provenientes do sangue destes doentes foram diferenciados OC. A actividade das células diferenciadas foi avaliada através de ensaios funcionais e da expressão de genes específicos de OC, *tracp*, *intb3* e *cstk*.

Nesta investigação observou-se que, independentemente da actividade da doença, os corticóides não diminuem os níveis de citocinas na articulação e que as terapêuticas biológicas são as que melhor controlam o estímulo osteoclastogénico. Foi também observado que os doentes sob anti-TNF apresentam um atraso no pico de formação de OC e são aqueles onde a expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ à superfície é mais baixa. Mais, observámos que nos monócitos a expressão basal de genes-chave é maior nos doentes apenas sob metotrexato quando comparados com os doentes sob terapêutica biológica. Por outro lado, a expressão génica em monócitos mostrou-se positivamente correlacionada com a actividade da doença levando-nos a especular que a expressão de genes que conduzem à diferenciação de monócitos em OC é influenciada pelo ambiente inflamatório.

Palavras-Chave: Monócitos, Osteoclastos, Citocinas, Artrite Reumatóide, Corticóides, Metotrexato, Anti-TNF, Tocilizumab

2. Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) is a systemic disease that leads to joint destruction and is characterized by hyperactivation of the immune system that leads, not only to chronic inflammation, but also to stimulation of bone resorption by activation of osteoclasts (OC). Studies showed that several cytokines, namely interleukin (IL)-1, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF), play a very important role in inflammation but also stimulate OC activation. Recently new therapeutic approaches were developed against key-players in RA like TNF (anti-TNF therapies) and IL-6 (anti-IL-6 receptor, tocilizumab), the so called biological therapies. However we still do not know what is the exact effect of the new therapeutics on human bone.

In this work we studied the systemic and local (articular) inflammatory environment in RA patients under several therapies (corticoids, methotrexate, anti-TNF and tocilizumab) and we stimulated circulating monocytes from these patients to differentiate into OC. The activity of the cultured cells was accessed through two functional assays and by studying the expression OC-specific genes, *tracp*, *intb3* and *ctsk*.

We have found that, regardless of disease activity, corticoids don't regulate local cytokine levels and that the biological therapeutics are the ones that better control osteoclastogenic stimuli. We also observed that anti-TNF patients have a delay in OC formation and less $\alpha_v\beta_3$ integrin surface expression. Moreover, it was found that in monocytes from methotrexate patients, the basal expression of key genes is higher than in patients under biological therapeutic. Monocytes genetic expression correlates with disease activity suggesting that the expression of genes in monocytes that lead to differentiation in OC is regulated by the inflammatory environment.

Key-Words: Monocytes, Osteoclasts, Cytokines, Rheumatoid Arthritis, corticosteroids, methotrexate, Anti-TNF, Tocilizumab

3. Introdução

O osso humano é um tecido vivo composto por uma matriz extracelular óssea sobre a qual se depositam cristais de hidroxiapatite e que está em constante remodelação. Este processo é mantido pela acção contínua da unidade multicelular óssea composta por dois tipos de células: os osteoblastos (OB), responsáveis pela formação da matriz óssea e sua mineralização, e os osteoclastos (OC), responsáveis pela reabsorção óssea [1]. Cada ciclo de reabsorção é precedido por um ciclo de formação. A reabsorção óssea, mediada pela actividade acoplada do osteoblasto e osteoclasto, depende da diferenciação e função dos mesmos e é controlada a nível molecular [2, 3]. Por outro lado, os osteoclastos funcionais estimulam a diferenciação de osteoblastos, activando a formação de osso nas lacunas de reabsorção (figura 3.1) [4].

A remodelação tem como objectivos não só estabelecer o pico de massa óssea (que ocorre entre os 20 e os 30 anos de idade) como também, na idade adulta, remover o osso danificado (com microfracturas) que posteriormente será substituído por nova matriz celular. Esta substituição requer que o processo de remodelação esteja em equilíbrio dinâmico, ou seja, que o volume de osso removido seja substituído por igual volume de osso formado [5]. Quando a reabsorção óssea predomina e não é compensada de forma eficaz pela formação de matriz, o osso torna-se osteoporótico, com baixa massa óssea, menos resistente, conduzindo ao aumento do risco de fracturas.

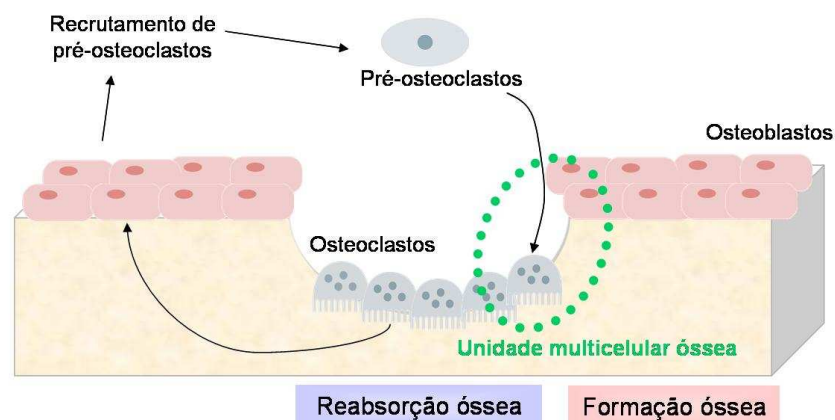


Fig. 3.1 - Equilíbrio dinâmico numa unidade multicelular óssea, na qual o osso é removido pelos osteoclastos e subsequentemente formado por osteoblastos (adaptado de 7).

O osteoclasto é uma célula gigante multinucleada cuja única função é reabsorver osso, não havendo outra célula capaz de o fazer. A diferenciação dos osteoclastos a partir de células precursoras da linhagem mielóide, os monócitos e macrófagos, depende da conjugação de dois factores, o *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) e a interacção *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK) e o seu ligando (RANKL) [6-8]. O RANKL está presente à superfície dos osteoblastos mas é também expresso por células do sistema imunitário, tanto na sua forma de receptor membranar como molécula solúvel [8]. Mais ainda, as células do sistema imunitário produzem citocinas pró-inflamatórias, como o *tumor necrosis factor* (TNF), a interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-17, que potenciam a osteoclastogénese e/ou a activação do osteoclasto indirectamente, isto é, aumentando a expressão de RANKL pelos osteoblastos [7, 9].

A fusão dos precursores de osteoclastos é despoletada quando o RANKL se liga ao RANK, activando uma proteína transmembranar (*Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein*, DC-STAMP) e uma bomba de protões dependente de ATP (ATP6V0D2). Os monócitos fundem-se dando origem a células gigantes multinucleadas, os pré-osteoclastos, que sofrem uma série de modificações morfológicas culminando na formação de uma membrana ondulada (*ruffled border*) característica dos osteoclastos.

Simultaneamente às alterações morfológicas ocorre indução da expressão de genes para proteínas específicas do osteoclasto [10], como a *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP), a catepsina K (CTSK) e a integrina $\alpha_v\beta_3$ (figura 3.2).

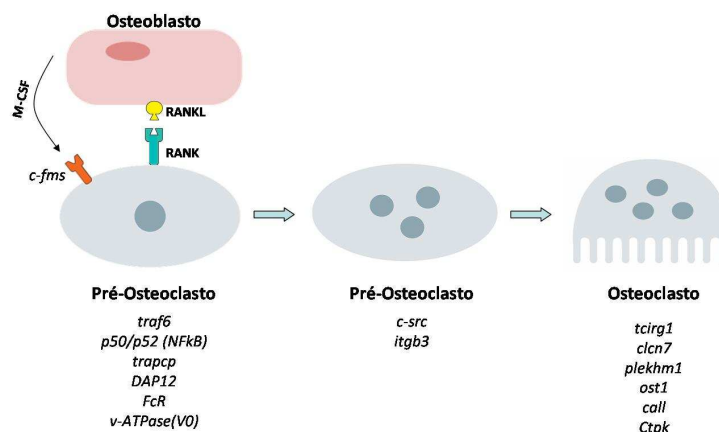


Fig. 3.2 - O osteoclasto diferencia-se a partir da fusão de células da linhagem mielóide na presença de dois estímulos essenciais, RANKL e M-CSF. O resultado final do processo de osteoclastogénese é uma célula multinucleada com capacidade de reabsorção de osso e que expressa um conjunto específico de genes (adaptado de 10)

A membrana ondulada aumenta a área de reabsorção do osteoclasto e as integrinas presentes fixam o osteoclasto através da ligação à osteopontina e à sialoproteína da matriz

óssea. Desta forma, o osteoclasto cria um microambiente específico selado pela membrana ondulada.

Bombas de prótons dependentes de ATP transportam para a lacuna iões H^+ acidificando o meio e os osteoclastos secretam para a lacuna TRAP e CTSK que são activadas no meio ácido e que degradam, respectivamente, a porção mineral e a porção de colagénio do osso [7, 8, 11-15]. Contudo, a fusão e polarização de osteoclastos pode ser inibida pelo receptor solúvel do RANKL, a osteoprotegerina (OPG), produzida pelos osteoblastos, que impede a ligação RANK-RANKL [16, 17]. De salientar ainda que o RANK e a OPG são membros da superfamília de receptores do TNF [18, 19] e o RANKL, seu ligando, é membro da superfamília do TNF [16].

As doenças inflamatórias sistémicas crónicas, como por exemplo a artrite reumatóide (AR), afectam profundamente o osso mas não são doenças ósseas primárias. Na AR a inflamação crónica atinge as pequenas e grandes articulações de uma forma simétrica. Nesta doença ocorre não só hiperplasia da membrana sinovial devido à infiltração de células do sistema imune com consequente lesão articular, como também erosões justa-articulares devido à activação de osteoclastos pela inflamação local (figura 3.3) [20]. As células que infiltram a membrana sinovial são maioritariamente linfócitos e macrófagos; estes produzem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que, por sua vez, atraem mais linfócitos e monócitos criando um ambiente cada vez mais inflamatório [21, 22]. No entanto nesta doença a hiper-activação do sistema imune ocorre não só nas articulações, como também a nível sistémico o que explica nestes doentes a febre, o cansaço, o emagrecimento, as alterações pulmonares e a perda de massa óssea conduzindo a osteoporose secundária. Dados recentes sugerem que até um pequeno aumento sub-clínico na inflamação sistémica pode despoletar alterações no metabolismo ósseo [23, 24].

Entre outros mecanismos, a hiper-activação do sistema imune conduz à inflamação crónica e a alterações no metabolismo ósseo [6, 25-27] (figura 3.3). Os linfócitos T e B, monócitos, macrófagos e células dendríticas, tanto pela secreção de citocinas, como pela interacção célula-célula através da ligação RANK/RANKL [7, 11] modelam a remodelação óssea. Estudos recentes demonstraram que citocinas pró-inflamatórias, particularmente a IL-1, a IL-6 e o TNF, desempenham um papel fundamental em situações inflamatórias e destrutivas, não só participando directamente no processo inflamatório, como também através da estimulação da actividade dos osteoclastos [28]. Para mais, foi observado que a quantidade de RANKL na

membrana sinovial de doentes com AR está aumentada em relação à OPG, indicando um estímulo pró-osteoclastogénico na articulação destes doentes [29].

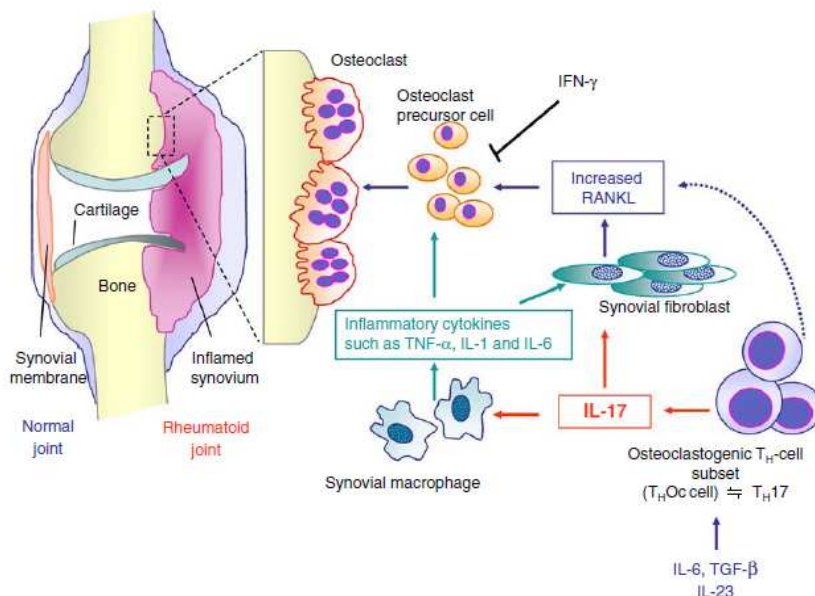


Fig. 3.3 - Na artrite reumatóide uma massa de tecido inflamatório, o *pannus*, invade a articulação. A população de células T helper 17 (T_H17) produz IL-17 que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos presentes na membrana sinovial. Estas citocinas potenciam a osteoclastogénese tanto através da sua acção sobre as células precursoras de osteoclastos como pela indução da expressão de RANKL pelos fibroblastos sinoviais. O RANKL é também expresso pelas células T_H17 que contribuem para a potenciação da formação de osteoclastos (*in 27*).

Por outro lado, em doenças não inflamatórias como a osteoartrose (OA), as citocinas podem também participar na modulação da reabsorção óssea. Apesar de haver poucos estudos publicados, aqueles que existem, revelam que na OA a IL-1 e o TNF exercem um papel importante na activação dos condrócitos e dos osteoclastos do osso subcondral [30-32].

Para tratar os doentes com AR tem-se utilizado de forma empírica anti-inflamatórios, como os corticóides, e fármacos imunossupressores, como por exemplo o metotrexato. Os corticóides foram a primeira terapêutica aplicada à AR; estes modulam o sistema imune e induzem imunossupressão com efeito dependente da dose [33-35]. O metotrexato, por outro lado, diminui a inflamação sistémica mas o mecanismo pelo qual actua é ainda desconhecido. Alguns estudos farmacológicos referem que o metotrexato diminui a angiogénese, diminui as citocinas pró-inflamatórias e aumenta as anti-inflamatórias e reduz a quimiotaxia dos neutrófilos [35, 36].

Recentemente, com o conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos que potenciam a inflamação articular, desenvolveram-se agentes imunomoduladores com o objectivo específico de bloquear elementos chave desta doença, como por exemplo as citocinas TNF e IL-6. Estas são as chamadas terapêuticas biológicas [35, 37-39].

A terapêutica anti-TNF reduz a tumefação articular assim como os níveis de proteínas pró-inflamatórias em circulação, nomeadamente IL-6, IL-8 e metaloproteinase da matriz (MMP)-3 [35, 40, 41]. O efeito destas novas moléculas sobre a perda de massa óssea sistémica causada pela inflamação (osteoporose secundária) ainda não está totalmente esclarecido (figura 3.4).

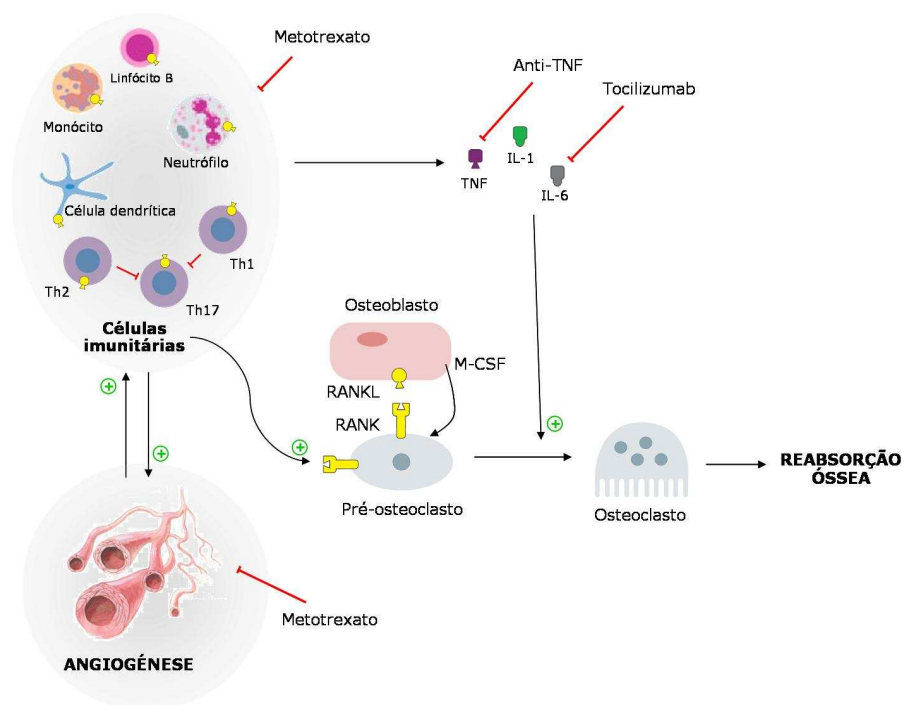


Fig. 3.4 – Acção de algumas das terapêuticas utilizadas no tratamento da AR e efeitos potenciais sobre a osteoclastogénese e consequente reabsorção óssea (adaptado de 36).

Em vários estudos foi observado que, em doentes com AR sob terapêutica anti-TNF, há diminuição da progressão da lesão articular e dos marcadores bioquímicos de reabsorção óssea em circulação [42-45]. No que respeita à terapêutica anti-receptor da IL-6 (anti-IL-6R, tocilizumab), foi observado em modelo animal que o número de osteoclastos diminui em animais tratados, mas os efeitos desta molécula no osso humano não foram ainda determinados [46, 47].

Este trabalho focou-se em dois objectivos fundamentais: por um lado pretendeu-se estudar o ambiente inflamatório sistémico e local (na articulação) na artrite reumatóide (paradigma das doenças inflamatórias) e na osteoartrose (exemplo de doença não inflamatória). Mais ainda pretendeu-se estudar o efeito das terapêuticas utilizadas na AR na diferenciação dos osteoclastos, sua actividade e expressão génica.

4. Material e métodos

4.1 - População em estudo

Foram recrutados para este estudo doentes do sexo feminino avaliados no serviço de Reumatologia e Doenças Ósseas Metabólicas do Hospital de Santa Maria que cumpriam os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) para AR [48] e para OA [49]. Foi aplicado um questionário para determinar parâmetros demográficos, terapêutica para a doença reumática e medidas de actividade da doença, o *Disease Activity Score* (DAS) 28 aplicado à AR. Todos os doentes assinaram um consentimento informado autorizando a colheita de amostras biológicas para fins de investigação. Este estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsínquia e com as boas práticas clínicas e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de Santa Maria.

Os doentes com AR foram divididos segundo a terapêutica que estavam a seguir: doentes apenas sob corticóides, doentes sob metotrexato (MTX), doentes sob anti-TNF concomitante ao MTX (denominados como anti-TNF) e doentes sob tocilizumab concomitante ao MTX (denominados como tocilizumab). A cada doente foi colhida uma amostra de sangue periférico para recolha de soro e isolamento de células mononucleadas circulantes. O soro recolhido foi centrifugado a 300g, 4°C e imediatamente congelado a -80°C. As amostras de líquido sinovial de doentes com diagnóstico de AR ou OA foram recolhidas de acordo com a prática clínica. O líquido sinovial recolhido foi centrifugado a 300g, 4°C e imediatamente congelado a -80°C.

4.2 – Doseamento de citocinas

Para detecção de citocinas circulantes no soro e fracção acelular do líquido sinovial foram utilizados dois ensaios: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e um ensaio de detecção múltipla de analitos. Ambos os métodos seguem o mesmo princípio, diferindo no método de detecção: na ELISA é colorimétrico e o ensaio de detecção múltipla faz uso de várias intensidades de fluorescência e tamanho de microesferas.

O sRANKL foi quantificado por *sandwich* ELISA nas amostras de soro e líquido sinovial utilizando o kit *ampli sRANKL human ELISA* (Immuno Diagnostic Systems Ltd., Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante.

Proteínas relacionadas com a osteoclastogénese, como a OPG, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, *macrophage inflammatory protein* (Mip)-1 α , *monocyte chemotactic protein* (MCP)-1 e *transforming growth factor* (TGF)- β e adipocinas, como a adiponectina e a leptina, foram doseadas no soro e líquido sinovial dos doentes através de um ensaio de detecção múltipla (*FlowCytomix*TM, Bender MedSystems, Áustria), de acordo com as instruções do fabricante (Anexos, figura A.1). Para análise dos dados de citometria utilizou-se o *FlowCytomix Pro 2.3* Software (Bender MedSystems, Áustria) [50].

4.3 – Isolamento de monócitos de sangue periférico

O sangue periférico heparinizado foi diluído na proporção de 1:1 em *phosphate buffered saline* (PBS) 1x e foi centrifugado na proporção de 1:2 sobre Ficoll (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich, E.U.A.) numa centrífuga de rotor basculante a 870g durante 30 minutos, à temperatura ambiente. O anel de células mononucleadas resultante foi retirado e lavado em PBS 1x e as células viáveis foram contadas num hemacitómetro com coloração azul tripiano 0,1% (Sigma-Aldrich, E.U.A.).

4.4 – Cultura de osteoclastos

In vitro foi demonstrado que os monócitos CD14⁺CD16⁻ se fundem, diferenciam e polarizam formando osteoclastos capazes de reabsorver osso quando estimulados com M-CSF e RANKL [7, 51]. As células mononucleadas isoladas foram semeadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen, Reino Unido) suplementado com 50000 unidades de Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen, Reino Unido), 2mM de L-Glutamina (Invitrogen, Reino Unido) e 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS; Invitrogen, Reino Unido) em placas de 96 e de 24 poços de fundo plano (Nunc, Alemanha). Nas placas de 96 poços foram semeadas 6,0x10⁵ células em 200 μ L de meio por poço e nas placas de 24 poços 1,5x10⁶ células em 1,5mL de meio por poço.

Para os ensaios de reabsorção as células foram colocadas a aderir sobre lamelas de osso bovino (Immuno Diagnostic Systems Ltd., Reino Unido) em placas de 96 poços. Estas lamelas provêm da porção cortical do osso e são cortadas com um diâmetro de 6mm e aproximadamente 200 μ m de espessura.

As culturas foram deixadas durante a noite a 37°C com 5% CO₂ para que os monócitos aderissem à placa. No dia seguinte, o meio foi substituído por igual quantidade de DMEM como acima descrito suplementado com sRANKL (Peprotech, E.U.A.) 60 ng/mL, M-CSF

(Peprotech, E.U.A.) 25 ng/mL, TGF- β (R&D systems, E.U.A.) 2,5 ng/mL e dexametasona (Sigma-Aldrich, E.U.A.) 1 μ M.

Uma vez que o pico de formação de osteoclastos está descrito tanto ao dia 14 [52, 53] como ao dia 21 [54, 55] de cultura, as células foram analisadas nestes dois momentos e ao dia 25, altura em que era esperada uma diminuição do número de células, bem como da sua actividade. Desta forma, as células foram mantidas em cultura durante 14, 21 e 25 dias sendo o meio mudado a cada 3 dias.

4.5– Ensaios funcionais

As células cultivadas durante 21 dias foram usadas em dois ensaios funcionais.

4.5.1 – Marcação de TRAP

O protocolo de marcação da enzima citoplasmática TRAP foi seguido como especificado no *Acid Phosphate, Leukocyte Kit (TRAP)* (Sigma-Aldrich, E.U.A.). A TRAP desfosforila o *Naphtol AS-BI Phosphate* e o naftol livre vai reagir com um sal formando um precipitado colorido no citoplasma celular.

As células foram observadas ao microscópio óptico acoplado a uma câmara fotográfica (Leica, Alemanha) a uma ampliação de 400x e contabilizaram-se as células TRAP positivas com três ou mais núcleos.

4.5.2 – Ensaio de reabsorção

As células semeadas sobre as lamelas de osso foram incubadas com hipoclorito de sódio 5% (Sigma-Aldrich, E.U.A.); de seguida as lamelas foram coradas com azul de toluidina 0,1% (Sigma-Aldrich, E.U.A.). O azul de toluidina cora de azul-arrocheado estruturas com pH ácido, neste caso, as lacunas de reabsorção. As lamelas foram lavadas e observadas ao microscópio óptico com câmara acoplada (Leica, Alemanha).

4.6 – Expressão génica

4.6.1 – Extracção de RNA

Foi extraído RNA de monócitos e das células sob estímulo ao 21º dia de cultura, utilizando o *RNeasy Plus Micro Kit* (Quiagen, Alemanha) de acordo com as indicações do fabricante. Este *kit* permite extrair RNA de um pequeno número de células (máximo de 5x10⁵). Brevemente, as células são lisadas e o RNA é ligado à membrana de sílica da coluna. De

seguida efectua-se um tratamento com DNaseI para remover vestígios de DNA genómico. O RNA foi eluído com água livre de RNases.

A concentração do RNA foi determinada espectrofotometricamente utilizando o *Nanodrop* (Fisher Scientific, E.U.A.). Foi ainda determinada a qualidade das amostras no *Agilent 2100 Bioanalyser* (Agilent Technologies, E.U.A.) através do *RNA Integrity Number* (RIN) obtido pelo *Agilent RNA 6000 Pico Kit* (Agilent Technologies, E.U.A.). Esta plataforma permite a análise das amostras de RNA num chip através de electroforese capilar [56, 57]. Após determinação da sua concentração e qualidade, o RNA foi armazenado a -80°C.

4.6.2 – Síntese de cDNA

O cDNA resulta da transcrição de RNA mensageiro num processo catalizado pela enzima transcriptase reversa. Para síntese de cDNA foi utilizado o *DyNAmo cDNA Synthesis kit* (Finnzymes, Finlândia) partindo-se de uma concentração de 0,6 ng/μL de RNA e utilizando-se *random hexamers* (60ng/μl). A reacção foi efectuada no *Piko Thermal Cycler* (Finnzymes, Finlândia) segundo as condições recomendadas pelo fabricante: 30 minutos, 37°C e 5 minutos, 85°C.

Uma vez que da reacção de síntese de cDNA resultam dímeros de RNA-DNA, foi assumido que a eficiência da reacção é de 100% pelo que a concentração de cDNA será de 0,6 ng/μL. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

4.6.3 – Curvas-padrão

A eficiência do RT-PCR foi controlada através de curvas-padrão para cada par de *primers* (Anexos, tabela A.1).

O RNA standard utilizado foi extraído de osso trabecular proveniente de indivíduos com massa óssea normal, sem factores de risco para osteoporose e sem outras doenças associadas. A quantidade de RNA inicial utilizada foi de 30 ng e foram realizadas diluições de 1:5 subsequentes. Os genes de proteínas específicas de osteoclastos (catepsina K, TRAP e integrina β₃) e um gene padrão (*housekeeping gene*, rRNA 18s) foram analisados por RT-PCR no *Rotor Gene 6000* (Corbett Research, Reino Unido).

Os *primers* foram desenhados recorrendo ao *software* Primer-BLAST [58] e atendendo a uma série de características descritas nos Anexos (tabela A.1).

As reacções de PCR foram preparadas utilizando o *DyNAmo Flash SYBR Green qPCR kit* (Finnzymes, Finlândia), de acordo com as instruções do fabricante (Anexos, tabelas A.2 e

A.3). O *SYBR green* marca especificamente o DNA em cadeia dupla e emite fluorescência quando se liga ao produto sintetizado na reacção de PCR.

4.6.4 – Quantificação da expressão génica

Para analisar os resultados de expressão génica foi utilizado o método da recta padrão e o *software* Rotor-gene 6000 series software v1.7 (Corbett Research - Qiagen, Alemanha). O método preciso pode ser consultado nos anexos (figura A.2)

4.7 – Frequência de células $\alpha_v\beta_3^+$

Aos dias 14, 21 e 25 foram recolhidas células para ensaios de citometria de fluxo. Analisou-se a expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$ característica das células multinucleadas precursoras de osteoclastos e osteoclastos. As células foram removidas dos poços com Tripsina/EDTA 0,05% sendo de seguida lavadas em PBS 1x. Foi utilizado para marcação de superfície o anticorpo anti-CD51/CD61-FITC (clone 23C6, eBioscience, Reino Unido). As populações foram avaliadas no FACS Calibur (BDBiosciences, E.U.A.) tendo-se determinado a percentagem de células positivas para a integrina $\alpha_v\beta_3$. Os resultados de citometria foram analisados com o *software* *FlowJo* v.7.5 para Macintosh (TreeStar, Inc., E.U.A.).

4.8 - Análise estatística

Os resultados foram analisados de acordo com a sua distribuição recorrendo ao teste não-paramétrico Mann-Whitney, comparando os grupos de doentes entre si dois a dois (amostras independentes, AR com corticóides, AR com metotrexato, AR com anti-TNF, AR com tocilizumab e OA). Todas estas comparações foram ajustadas para variáveis confundidoras como a idade e a actividade da doença, no caso da AR.

Considerou-se que valores de *p* menores que 0,05 eram estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada usando o *software* GraphPad Prism (GraphPad software, Inc., E.U.A.).

5. Resultados

5.1 – Características da amostra

Colheram-se amostras a 48 doentes do sexo feminino: 40 tinham diagnóstico de AR (6 sob corticóides, 12 sob MTX, 12 sob anti-TNF e 12 sob tocilizumab) e 8 de OA. Os doentes com AR foram separados de acordo com a terapêutica a que estavam sujeitos na altura da colheita e cujas características estão resumidas na tabela 5.1. As idades são comparáveis em todos os doentes com AR tratados com diferentes terapêuticas sendo as doentes com OA significativamente mais velhas que as doentes com AR sob tocilizumab ($p=0,0162$). As diferenças entre os grupos com AR residem na actividade da doença medida pelo índice DAS28. Os doentes sob anti-TNF apresentam menor actividade da doença quando comparados com doentes sob tocilizumab ($p=0,0105$), sob MTX ($p=0,0008$) ou sob corticóides ($p=0,0044$).

Tabela 5.1 – Características dos grupos presentes neste estudo

	Nº de Doentes	Idade (anos)	IMC (Kg/cm²)	DAS28
Corticóides	6	62±15	25,89±4,83	5,31±1,13
MTX	12	60±13	28,29±4,20	4,85±1,24
anti-TNF	12	54±12	27,75±2,67	2,71±0,83
Tocilizumab	10	45±15	30,11±4,20	4,2±1,34
OA	8	65±11	27,29±3,37	NA

Os resultados apresentados são média±desvio padrão; MTX – Metotrexato, TNF – *Tumor necrosis factor*, OA – Osteoartrose, IMC – Índice de Massa Corporal, DAS 28 – Disease Activity Score 28, NA – não aplicável

5.2 – Doseamento de citocinas

5.2.1 – Doseamento de citocinas no soro

Aos doentes com OA e AR sob terapêutica com corticóides, MTX, anti-TNF e tocilizumab foi colhido soro onde foram doseadas diversas proteínas. Estes resultados estão representados na figura 5.2.

É notório que a quantidade de IL-6 circulante nos doentes sob tocilizumab é a mais elevada entre todos os grupos (figura 5.1). Esta diferença é estatisticamente significativa quando comparamos doentes sob tocilizumab com doentes sob MTX ($p=0,0208$), sob anti-TNF ($p=0,0010$) ou com OA ($p=0,0393$). Por outro lado, observámos uma redução na quantidade

de IL-6 circulante nos doentes tratados com anti-TNF comparando com o grupo dos corticóides ($p=0,0088$).

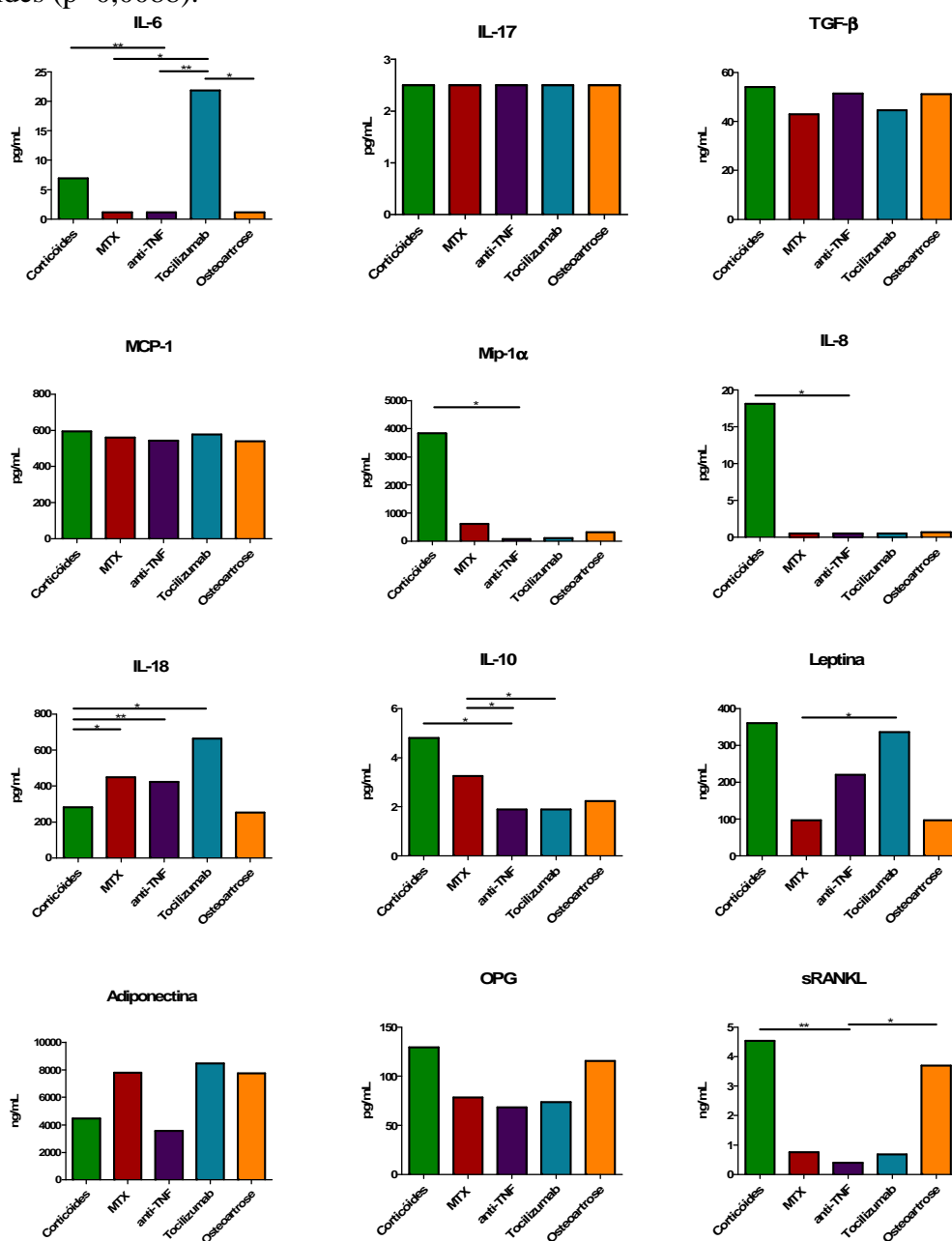


Fig. 5.1 – Doseamento de citocinas no soro de doentes com OA ou AR sob diversas terapêuticas. As barras representam medianas. (* $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$).

Os níveis de alguns quimioattractores são superiores em doentes tratados com corticóide do que em doentes sob anti-TNF e estas diferenças são estatisticamente significativas para o Mip-1 α ($p=0,0499$) e para a IL-8 ($p=0,0244$). No entanto, no caso da IL-18 observa-se um padrão diferente entre os grupos de doentes com AR, sendo que os doentes sob corticóide são os que têm menor concentração desta proteína.

A citocina anti-inflamatória IL-10 encontra-se diminuída nos doentes sob terapêutica biológica (anti-TNF e Tocilizumab) de modo significativo em relação aos tratados com não biológicos.

Analisando a quantidade de sRANKL observamos que está diminuída nos doentes sob anti-TNF sendo esta diferença significativa apenas para os doentes sob corticóide ($p=0,0069$) e para os doentes com OA ($p=0,0134$).

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando se analisaram as proteínas IL-17, TGF- β , MCP-1, adiponectina e OPG.

Nos doentes com AR, os níveis das diversas proteínas foram ainda correlacionados com a actividade da doença (figura 5.2).

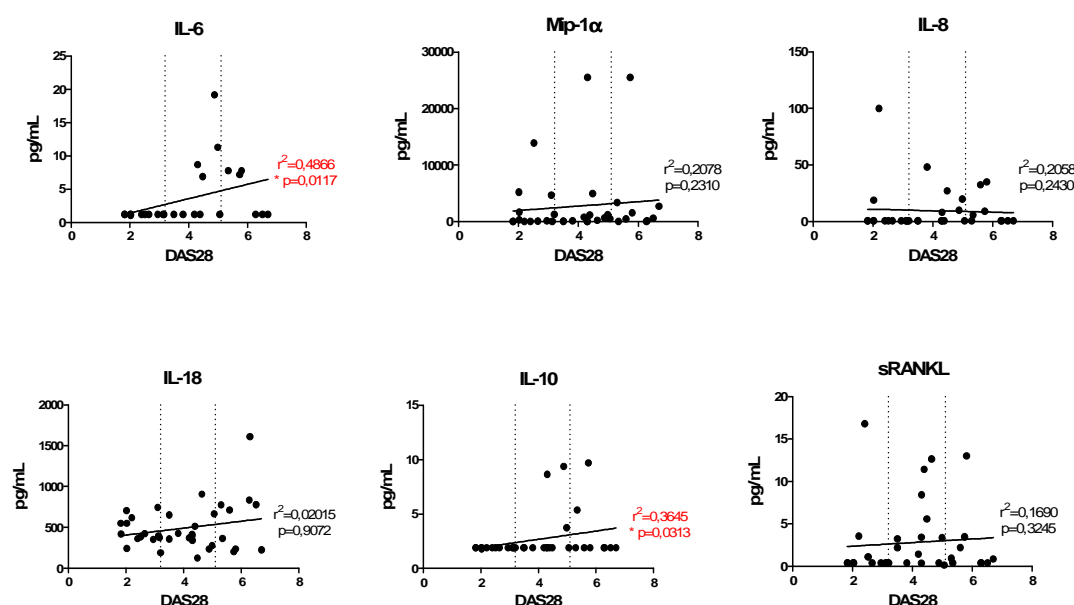


Fig. 5.2 – Correlação entre os níveis de citocinas circulantes e a actividade da doença/estado inflamatório do doente dado pelo DAS28. DAS28 abaixo de 3,2 corresponde a actividade de doença controlada, entre 3,2 e 5,1 a doença moderada e acima de 5,1 significa que a doença está muito activa (* $p<0,05$).

Uma vez que o tocilizumab bloqueia os receptores de IL-6 é esperado que os níveis desta proteína estejam elevados em circulação, independentemente da actividade da doença. Observamos então que mesmo removendo os doentes sob tocilizumab desta análise, os níveis de IL-6 se correlacionam positivamente com o estado inflamatório dos doentes.

Foi ainda observada a existência de uma correlação positiva entre a citocina anti-inflamatória IL-10 e a actividade da doença; contudo, nenhuma das outras citocinas se correlacionou com o estado inflamatório dos doentes.

A razão entre os níveis de sRANKL e OPG circulantes dá-nos informação sobre a actividade da reabsorção óssea, sendo esta maior quando a razão sRANKL/OPG está mais

elevada. Na figura 5.3 (primeiro painel) podemos observar que esta razão se encontra diminuída nos doentes sob anti-TNF quando comparada com os doentes apenas sob corticóides ($p=0,0430$) e com os doentes com OA ($p=0,0218$). Contudo, não foi encontrada qualquer correlação entre a razão sRANKL/OPG e a actividade da AR (figura 5.3, segundo painel).

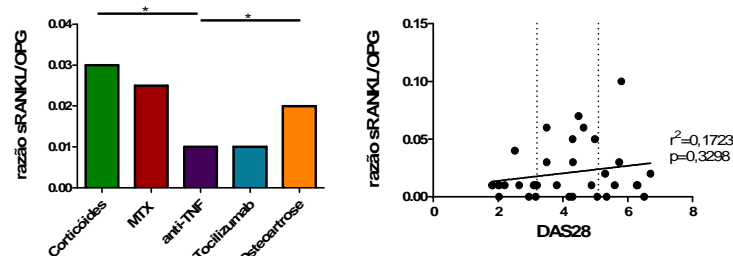


Fig. 5.3 – Análise da razão entre os níveis de sRANKL e OPG circulantes no soro. Os valores apresentados no primeiro painel representam medianas. (* $p<0,05$).

Na figura 5.4, primeiro painel, observamos que a leptina está aumentada nos doentes com AR sob tocilizumab quando comparados com os doentes sob MTX ($p=0,0270$). A leptina não se correlacionou significativamente com o índice de massa corporal apesar de existir uma relação positiva (figura 5.4, painel central), nem com a idade sendo que neste caso os parâmetros variaram de modo inverso (figura 5.4, último painel).

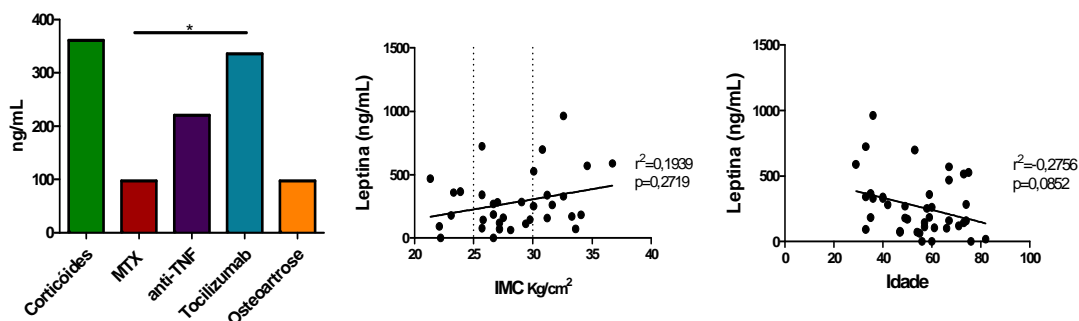


Fig. 5.4 – Análise dos níveis circulantes de leptina. Para valores de IMC abaixo dos 25 Kg/cm² o indivíduo tem peso normal, quando o IMC se situa entre os 25 e os 30 Kg/cm² tem excesso de peso e IMC acima dos 30Kg/cm² significa obesidade. Os valores apresentados no primeiro painel são medianas. (* $p<0,05$).

5.2.2 – Doseamento de citocinas no líquido sinovial

Nos doentes com AR ou com OA (tabela 5.2) que apresentavam líquido intra-articular foi colhido líquido sinovial e retirada a fracção acelarar do mesmo onde foram doseadas diversas proteínas. Os doentes com AR estavam medicados com corticóides e MTX. Estes resultados estão representados na figura 5.5.

Tabela 5.2 - Características dos grupos presentes neste estudo

	Nº de doentes	Idade (anos)	IMC (Kg/cm ²)	DAS28
Corticóides	3	72±10	24,00±3,77	4,37±0,17
MTX	5	51±8	25,02±5,95	4,96±1,84
OA	5	78±10	28,36±1,43	NA

Os resultados apresentados são média±desvio padrão; MTX – Metotrexato, OA – Osteoartrose, IMC – Índice de Massa Corporal, DAS 28 – Disease Activity Score 28, NA – não aplicável

As doentes com AR sob MTX são significativamente mais jovens que as doentes com AR sob corticóides ($p=0,0357$) e que as doentes com OA ($p=0,0159$).

Comparando os níveis das diversas proteínas estudadas no líquido sinovial e soro observaram-se algumas diferenças significativas (figura 5.5). Há citocinas que estão significativamente aumentadas no líquido sinovial em relação ao soro, independentemente da terapêutica a que os doentes estão sujeitos, como a IL-6 (corticóides $p=0,0275$; MTX $p=0,0074$), a IL-8 (corticóides $p=0,0238$; MTX $p=0,0017$) e a IL-10 (corticóides $p=0,0325$; MTX $p=0,0497$). No entanto outras citocinas só se encontram significativamente aumentadas no líquido sinovial em doentes sob corticóides (MCP-1; $p=0,0476$) e em doentes sob MTX (OPG, $p=0,0027$). Por outro lado o TGF- β está significativamente diminuído no líquido sinovial em relação ao soro, independentemente da terapêutica (corticóides $p=0,0238$; MTX $p=0,0019$); no entanto ao analisar a adiponectina ($p=0,0080$) e a IL-18 ($p=0,0037$) observamos que estas só se encontram aumentadas no soro em relação ao líquido sinovial nos doentes sob MTX.

Na OA observamos um padrão semelhante onde encontramos citocinas significativamente aumentadas no líquido sinovial em relação ao soro, como a IL-6 ($p=0,0042$), a IL-8 ($p=0,0032$), o MCP-1 ($p=0,0101$) ou a OPG ($p=0,0043$), e outras significativamente diminuídas no líquido sinovial como o TGF- β ($p=0,0061$), a adiponectina ($p=0,0079$) ou a IL-18 ($p=0,0025$).

No líquido sinovial observou-se que apenas a IL-17 ($p=0,0357$), o Mip-1 α ($p=0,0358$) e a IL-18 ($p=0,0357$) estão significativamente aumentadas nos doentes sob corticóide em relação aos tratados com MTX. Por outro lado, para a maioria das citocinas os doentes sob corticóides têm níveis aumentados destas proteínas relativamente aos doentes com OA (IL-6 $p=0,0357$; IL-17 $p=0,0357$; Mip-1 α $p=0,0358$; IL-18 $p=0,0357$; IL-10 $p=0,0357$). Mais ainda, observamos que os níveis de IL-6 no líquido sinovial de doentes com OA são menores que nos doentes com AR tratados com MTX ($p=0,0317$). Em contraponto, nos doentes com OA

os níveis de OPG no líquido sinovial são muito superiores aos dos doentes com AR tratados com MTX ($p=0,0317$).

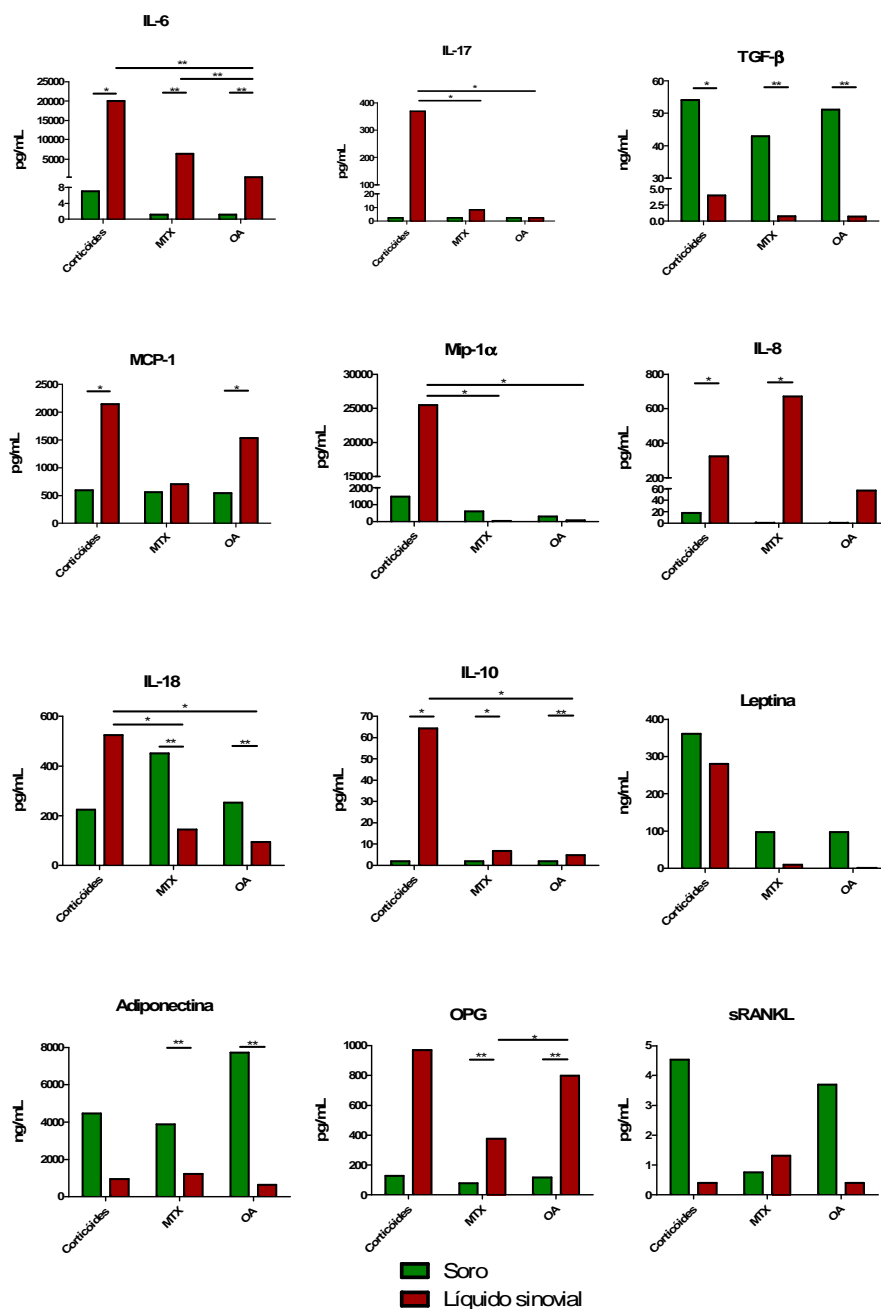


Fig. 5.5 – Doseamento de citocinas no soro e líquido sinovial dos doentes com OA e AR sob corticóides ou MTX. Os valores representam medianas (* $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$).

Não se observam diferenças significativas entre grupos quando se analisam os níveis de sRANKL e leptina no líquido sinovial quer entre os grupos, quer comparando com o soro de doentes com as mesmas características.

5.3 – Avaliação da diferenciação de monócitos em osteoclastos

Para este estudo recolheram-se amostras a um total de 22 doentes da amostra total inicial (tabela 5.1) todos com o diagnóstico de AR e cujas características estão resumidas na tabela 5.3. A actividade da doença avaliada pelo DAS 28 é significativamente diferente entre os grupos pois os doentes sob anti-TNF apresentam menor actividade da doença quando comparados com doentes sob tocilizumab ($p=0,0350$) e sob MTX ($p=0,0082$).

Tabela 5.3 - Características dos doentes utilizados para avaliação da diferenciação de monócitos em osteoclastos

	Nº de Doentes	Idade (anos)	IMC (Kg/cm ²)	DAS28
Corticóides	3	52±17	26,08±5,63	6,70±n.d.
MTX	6	60±15	28,72±4,24	4,97±1,31
anti-TNF	7	58±11	28,28±2,29	2,77±0,95
Tocilizumab	6	48±18	30,07±5,04	4,32±1,50

Os resultados apresentados são média±desvio padrão; MTX – Metotrexato, TNF – *Tumor necrosis factor*, IMC – Índice de Massa Corporal, DAS 28 – Disease Activity Score 28, n.d. – não determinado

5.3.1 – Curvas-padrão

Para cada gene alvo foi obtida uma curva-padrão (Material e métodos, secção 4.7.4, Anexos, figura A.2) estando as suas características descritas na tabela 5.4.

Tabela 5.4 – Características das rectas-padrão para cada gene alvo e para o gene referência (rRNA 18s)

	Gene	Threshold	Eficiência	R ²	Declive	Intersecção Y
Osteoclasto	<i>Ctsk</i>	0.100	88%	0.999	-3.633	29.906
	<i>Intb3</i>	0.099	95%	0.996	-3.443	23.177
	<i>tracp</i>	0.135	99%	0.984	-3.346	25.208
	rRNA 18s	0.011	97%	0.995	-3.390	20.927

Estes parâmetros foram utilizados para calcular a quantidade de RNA de cada gene de interesse utilizando a fórmula e subsequente normalização descritas na secção Material e métodos, 4.7.4 (Anexos, figura A.2).

5.3.2 – Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP)

Ao 21º dia de cultura as células foram sujeitas a um ensaio de detecção da enzima TRAP. Nestes ensaios os doentes com AR sob corticóides foram excluídos devido ao reduzido número de amostras. Após coloração as amostras foram observadas ao microscópio óptico

(ampliação 400x) e o número de células TRAP⁺ com 3 ou mais núcleos – pré-osteoclastos e osteoclastos – foi contado (figura 5.6).

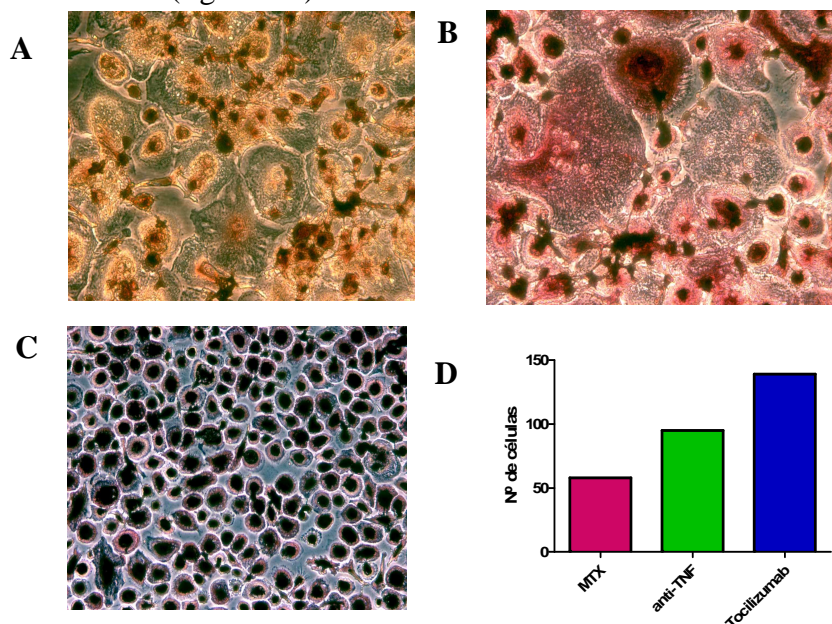


Fig. 5.6 – Osteoclastos e monócitos de um doente com AR sob anti-TNF. Painel A – OC ao dia 21 com marcação TRAP negativa (controlo); Painel B – OC ao dia 21 com marcação TRAP positiva. Painel C – Monócitos em cultura durante 21 dias sem estímulo; Painel D – número de células TRAP⁺ com 3 ou mais núcleos contadas na ampliação 400x; os resultados apresentados são medianas.

Ao observar as células sob estímulo durante 21 dias (figura 5.6, Painéis A e B), as diferenças para os precursores (monócitos) cultivados nas mesmas condições mas sem estímulo (Figura 5.6, Painel C) são notórias.

Os monócitos permanecem em monocamada aderente e não sofrem qualquer alteração morfológica. Já as células em cultura sob estímulo (agora designadas osteoclastos - OC) apresentam uma morfologia completamente diferente dos precursores e típica de osteoclastos: células gigantes com vários núcleos e com coloração TRAP positiva visível pelo depósito de corante no citoplasma, o que confere uma tonalidade vermelho-escuro ao citoplasma; em algumas células pode ainda ser observada a membrana ondulada.

Apesar de não haver diferenças significativas no número de células TRAP positivas com 3 ou mais núcleos, observamos que os doentes com AR sob Tocilizumab têm maior número de células com mais de três núcleos seguindo-se os doentes com AR sob anti-TNF e por último os doentes com AR sob MTX (figura 5.6, painel D).

A expressão do gene codificante da enzima TRAP foi avaliada em monócitos (dia 1 de cultura) e em culturas totais de OC ao 21º dia de cultura, das quais foi extraído RNA. Os resultados do RT-PCR, normalizados em relação ao rRNA18s estão resumidos na figura 5.7.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre grupos estudados mas é de notar que a expressão relativa de *tracp* é mais elevada nos doentes tratados apenas com MTX do que nos doentes tratados com terapêutica biológica.

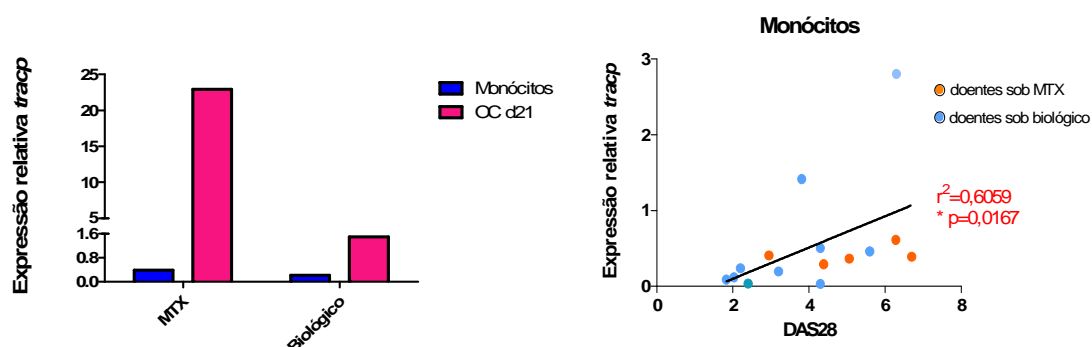


Fig. 5.7 – Expressão relativa de *tracp* e correlação com a actividade da doença. Os resultados apresentados no primeiro painel são medianas (* $p<0,05$).

A expressão relativa deste gene nos OC não se correlaciona com a actividade da doença, mas a expressão nos monócitos está correlacionada com este parâmetro (figura 5.7). Para compreender a relação entre o ambiente pró-inflamatório e a expressão génica nos monócitos, esta foi correlacionada com os níveis de algumas citocinas directamente envolvidas na osteoclastogénese (OPG, sRANKL e IL-17) e com a razão sRANKL/OPG.

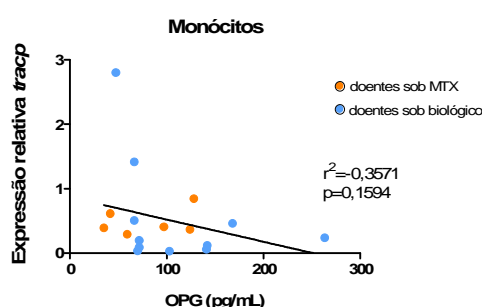


Fig. 5.8 – Correlação entre a expressão relativa de *tracp* nos monócitos e os níveis de OPG no soro dos mesmos doentes.

A expressão génica de *tracp* nos monócitos não se correlaciona com os níveis das citocinas estudadas; no entanto, foi encontrada uma relação com a OPG (figura 5.8) que nos indica que quanto maiores os níveis de OPG circulante menor a expressão de *tracp* nos precursores de osteoclastos.

5.3.3 – Integrina $\alpha_v\beta_3$

As células em cultura foram recolhidas aos três *time-points* (dias 14, 21 e 25 de cultura) e marcadas para a integrina $\alpha_v\beta_3$ (CD51/CD61-FITC) de forma a analisar a percentagem de células gigantes multinucleadas $\alpha_v\beta_3^+$ (figura 5.9, painel superior). Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 5.9 (painel central). Foi ainda analisada a intensidade de

fluorescência média do marcador nestas células, indicativo da quantidade de integrina expressa à superfície celular (figura 5.9, painel inferior).

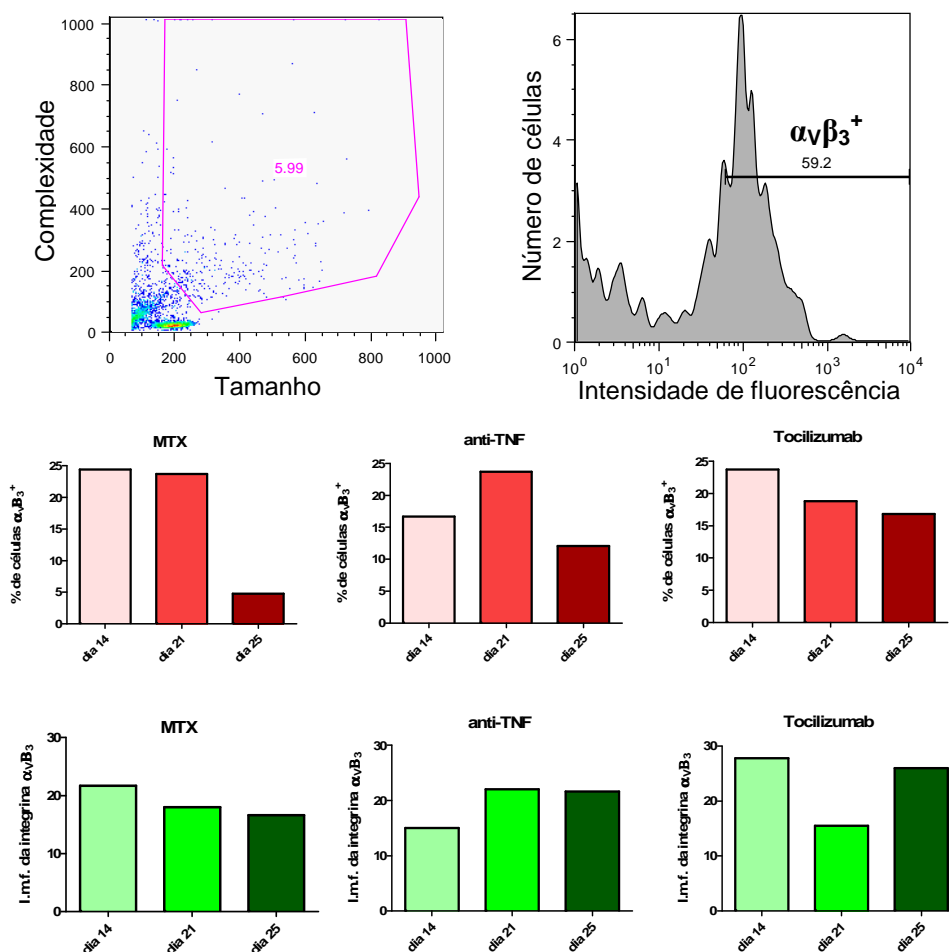


Fig. 5.9– Detecção da expressão de $\alpha_v\beta_3$ à superfície celular por citometria de fluxo. Painel superior – Análise das células incluídas na região demarcada pela linha rosa por serem gigantes (maior tamanho) e multinucleadas (mais complexas) para determinação da percentagem de células $\alpha_v\beta_3^+$ (exemplo de um doente sob tocilizumab analisado ao 14º dia de cultura); Painel central – percentagem de células gigantes multinucleadas que expressam a integrina de membrana $\alpha_v\beta_3$. Painel inferior – intensidade média de fluorescência (i.m.f.) da integrina $\alpha_v\beta_3$. Os resultados apresentados são medianas.

Podemos observar que ao 14º dia de cultura tanto nos doentes sob MTX como nos doentes sob tocilizumab a percentagem de células gigantes multinucleadas $\alpha_v\beta_3^+$ e a quantidade de integrina expressa à superfície é máxima e que diminui ao longo do tempo, com especial atenção para a diminuição no número de células do 21º para o 25º dia de cultura dos doentes sob MTX. Nos doentes sob anti-TNF observa-se que o pico de células $\alpha_v\beta_3^+$ e de integrina superficial só surge ao 21º dia de cultura.

A expressão génica desta proteína foi também estudada em monócitos e OC provenientes de doentes sob MTX e sob terapêutica biológica (anti-TNF e tocilizumab) e os resultados normalizados estão resumidos na figura 5.10. Tal como esperado, a expressão de *intb3* é

muito maior nos OC diferenciados do que nos monócitos, sendo esta diferença estatisticamente significativa nos doentes sob terapêutica biológica ($p=0,0195$). Mais ainda, é de notar que nos doentes sob MTX a expressão de *intb3* nos monócitos é estatisticamente superior ($p=0,0463$) à sua expressão nos doentes sob terapêutica biológica. De salientar que a expressão deste gene nos monócitos está correlacionada com a actividade da doença representada pelo índice DAS28 (figura 5.10).

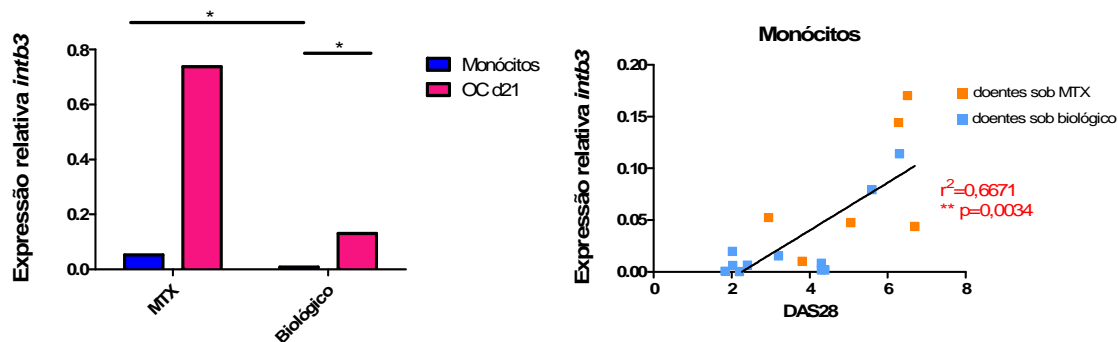


Fig. 5.10 - Expressão relativa de *intb3* e sua relação com a actividade da doença. Os resultados apresentados no primeiro painel são medianas (* $p<0,05$; ** $p<0,005$).

Correlacionando de seguida a expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ com a intensidade média de fluorescência desta proteína à superfície celular obtida por citometria de fluxo (ambas as observações ao 21º dia de cultura), observamos que estas apresentam uma tendência de associação positiva (figura 5.11).

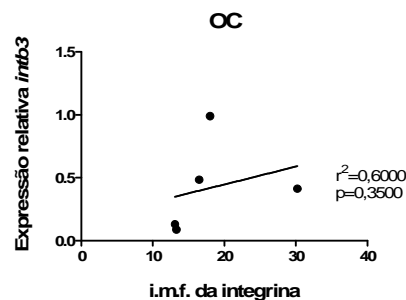


Fig. 5.11 - Correlação entre a expressão de *intb3* nos OC e a intensidade média de fluorescência (i.m.f) da integrina à superfície celular obtida por citometria de fluxo dos mesmos doentes.

5.3.4 – Catepsina K

Para avaliar a função dos OC ao 21º dia de cultura as células foram sujeitas a um ensaio histológico de coloração para as lacunas de reabsorção. Estas são formadas por osteoclastos funcionais e resultam da acção de enzimas osteolíticas como a catepsina K e a TRAP. Todas as culturas de doentes com AR sob diferentes terapêuticas apresentaram a formação de lacunas de reabsorção (exemplo na figura 5.12, Painel B e C).

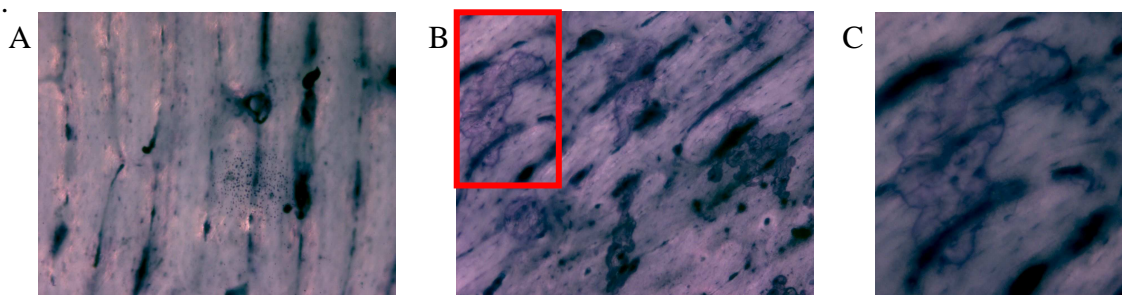


Fig. 5.12 – Avaliação das lacunas de reabsorção formadas pelos osteoclastos ao dia 21 de cultura num doente com AR sob anti-TNF. Painel A – Lamela de osso corada com azul de toluidina. Painel B – Lamela de osso sobre a qual foram cultivadas células durante 21 dias com estímulo. Coloração com azul de toluidina. (Painéis A e B com ampliação de 200x). Painel C – ampliação da zona delimitada pelo rectângulo vermelho (400x).

Para avaliar a função/atividade do osteoclasto de uma forma quantitativa analisou-se a expressão génica de catepsina K nos monócitos (dia 1 de cultura) e nos OC diferenciados. Os resultados desta análise estão resumidos na figura 5.13. Ao fim de 21 dias de cultura foi observado que os osteoclastos expressam maior quantidade de *ctsk* do que os monócitos tanto nos doentes com AR sob MTX ($p=0,0357$) como nos doentes com AR sob terapêutica biológica (anti-TNF e tocilizumab; $p=0,0011$).

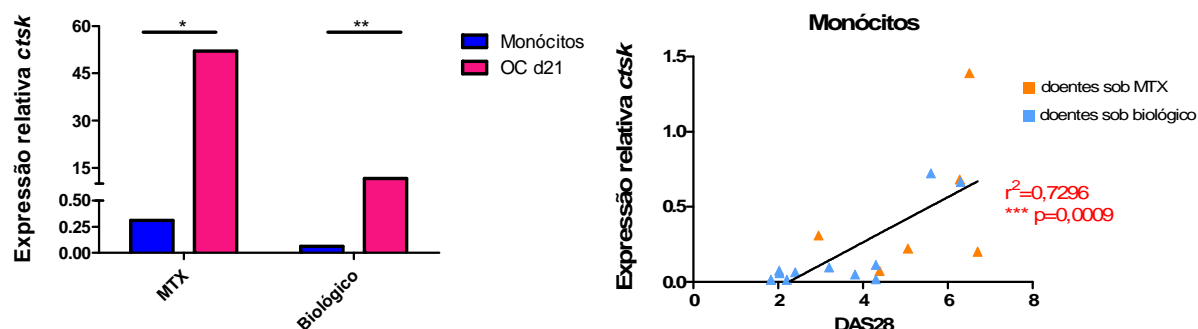


Fig. 5.13 - Expressão relativa de *ctsk* e sua correlação com a actividade da doença. Os resultados apresentados são medianas (* $p<0,05$; ** $p<0,005$; *** $p<0,001$).

Observa-se que nos doentes sob MTX a expressão de *ctsk*, tanto nos monócitos como nos OC é mais elevada que nos doentes sob terapêutica biológica, ainda que esta diferença não seja estatisticamente significativa. Mais ainda, nos monócitos existe expressão de *ctsk*, ainda que muito basal, e esta correlaciona-se positivamente com o estado inflamatório da doença.

6. Discussão

Este trabalho foi desenvolvido tendo em vista dois objectivos principais. Por um lado pretendeu-se estudar o efeito de diversas terapêuticas no ambiente inflamatório sistémico e local (articular) da artrite reumatóide (AR). Por outro lado avaliou-se o efeito das diversas terapêuticas utilizadas em doentes com AR, nos precursores de osteoclastos (OC), na sua diferenciação em OC e na sua actividade.

A AR é uma doença que afecta maioritariamente indivíduos do sexo feminino [9] e a amostra para este estudo foi escolhida com base neste facto. Os doentes foram divididos em 4 grupos terapêuticos: doentes apenas a fazer corticóides, doentes medicados com MTX, doentes com MTX e anti-TNF e por último, doentes medicados com MTX e tocilizumab (uma nova terapêutica ainda em fase de ensaio clínico).

Neste trabalho quisemos estudar citocinas que se sabiam ser importantes na fisiopatologia da AR bem como outras que influenciam a osteoclastogénese, uma vez que um dos nossos objectivos era o de avaliar diferenças no comportamento dos precursores dos OC e nos OC. Na AR as citocinas chave do processo inflamatório são a IL-1, o TNF e a IL-6 [21, 22]; neste trabalho não foram doseadas a IL-1 e o TNF pois estudos prévios do nosso grupo mostraram que os níveis destas citocinas estão abaixo do limiar de detecção do método utilizado. As citocinas pró-inflamatórias (Resultados, figura 5.1), IL-6 e IL-17, envolvidas na fisiopatologia da AR também potenciam a osteoclastogénese [9, 59]. No nosso trabalho observámos que ambas se encontram aumentadas no líquido sinovial dos doentes em relação ao soro. Observámos que no líquido sinovial, os níveis de IL-17 estão aumentados apenas nos doentes sob corticóides por oposição aos doentes com MTX que têm níveis mais baixos, independente da actividade da doença, sendo comparáveis aos dos doentes com patologia não inflamatória (OA) [9].

O caso da IL-6 é particular uma vez que lidamos com uma terapêutica (tocilizumab) que bloqueia o receptor desta citocina, impedindo qualquer ligação da IL-6 aos seus receptores. Esta é a razão pela qual observámos que os níveis de IL-6 no soro de doentes com AR sob tocilizumab estavam mais elevados. Assim não incluímos os doentes sob tocilizumab nesta análise uma vez que, perante o modo de acção da terapêutica, a quantidade de IL-6 disponível é independente do estado inflamatório. Sendo esta uma citocina de fase aguda é razoável que a sua concentração se correlacione positivamente com a actividade da doença; quanto mais inflamatório é o estado do doente (maior DAS28) mais altos os níveis de IL-6 e por isso o

grupo de doentes que estava apenas sob terapêutica com corticóides é o grupo com níveis mais elevados desta citocina. Mais ainda, a IL-6 encontra-se muito aumentada na articulação dos doentes sob corticóide (comparando com o soro destes doentes) e mais baixa nos doentes sob MTX, semelhante ao encontrado nos doentes com OA. Estas observações podem fazer-nos crer que o MTX está a ter influência nos níveis de IL-6 locais, ao contrário dos corticóides que parecem não ter qualquer efeito a nível articular.

O papel do TGF- β na AR não é consensual uma vez que a sua acção depende do ambiente em que se encontra. Muitas vezes este é denominado uma citocina imunoreguladora por oposição a pró ou anti-inflamatória [60]. Muitos trabalhos dizem que se trata de uma citocina anti-inflamatória presente em elevados níveis na sinóvia que impede a degradação da cartilagem e inibe a proliferação de linfócitos [60-62]; outros trabalhos referem o TGF- β como um quimioatractor de monócitos e responsável pela hiperplasia sinovial [61]. O TGF- β é ainda proposto como uma das citocinas necessárias ao desenvolvimento de células T_H17 num ambiente pró-inflamatório [63]. Neste trabalho não encontramos diferenças entre os níveis de TGF- β no soro de doentes com AR sob diferentes terapêuticas e no soro de doentes com OA. No entanto os níveis de TGF- β no soro são significativamente superiores aos do líquido sinovial. Estes resultados levam-nos a especular sobre o papel do TGF- β na inflamação sistémica.

Os quimioatractores têm também um papel importante na potenciação da cascata inflamatória pois são os responsáveis pelo recrutamento de células imunes inflamatórias. Assim, foram analisados diversos quimioatractores como o MCP-1, MIP-1- α , IL-8 e IL-18, e os seus níveis não se correlacionaram com a actividade da doença (DAS28) (Resultados, figura 5.2). No soro (Resultados, figura 5.1) observámos que os doentes com AR sob corticóide têm níveis mais elevados de MIP-1- α e IL-8 quando comparados com doentes sob outra terapêutica ou com OA, ao passo que no líquido sinovial (Resultados, figura 5.5) o MIP-1- α está aumentado nos doentes com AR sob corticóide quando comparando com o soro destes mesmos doentes e com o líquido sinovial dos doentes sob MTX ou com OA.

Estudos recentes revelam que o MCP-1 está directamente envolvido no recrutamento de precursores de osteoclastos [64, 65] e na activação destes [66], levando-nos a crer que esta é uma proteína importante na diferenciação de osteoclastos na articulação inflamada e o seu efeito é apenas neutralizado pela acção do MTX.

Por outro lado, o MIP-1- α é um quimioatractor preferencial de granulócitos na AR [67] e neste estudo observámos que apenas a terapêutica com MTX inverte as proporções entre

líquido sinovial e soro, sendo que os corticóides não têm qualquer efeito local sobre os níveis exacerbados de MIP-1- α . Esta descoberta é muito interessante na medida em que o MIP-1- α aumenta o recrutamento de linfócitos T activados para a articulação [67], aumentando também os níveis de RANKL e sRANKL e contribuindo assim para a osteoclastogénese.

A IL-8 é uma quimiocina secretada por vários tipos celulares e cujos alvos são granulócitos (alvos primários), células endoteliais, macrófagos e mastócitos. A IL-8 é um dos mediadores principais da inflamação actuando como quimioatractor e como factor angiogénico. Neste trabalho observámos que todos os grupos de doentes tinham os níveis séricos de IL-8 próximos de níveis não inflamatórios (como nos doentes com OA), com excepção dos doentes medicados apenas com corticóides e independentemente da actividade da doença. Já no líquido sinovial os níveis de IL-8 estão muito aumentados em relação ao soro e surpreendentemente os níveis mais altos encontram-se no líquido sinovial de doentes tratados com MTX.

Neste estudo observámos que a IL-18 tem um comportamento bastante diferente dos outros quimioatractores pois os doentes sob tocilizumab têm-na mais aumentada no soro que quaisquer outros doentes. Os níveis séricos de IL-18 nos doentes sob MTX e anti-TNF são mais elevados que nos doentes sob corticóides, independente da actividade da doença (Resultados, figura 5.2). Observamos ainda que esta citocina está presente em elevados níveis no líquido sinovial de doentes com AR apenas sob corticóides enquanto nos doentes sob MTX e com OA os níveis articulares de IL-18 são ainda mais baixos que no soro. A IL-18 é um quimioatractor, uma citocina pró-inflamatória e especula-se que está indirectamente envolvida na potenciação da osteoclastogénese pois induz a formação de células T_H17 e activação de macrófagos. No entanto há ainda muita controvérsia sobre o seu papel na osteoclastogénese pois também induz a produção de Interferão- γ (INF)- γ e *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM)-CSF pelas células T_H1 conduzindo à inibição da osteoclastogénese [68]. A controvérsia mantém-se pois no líquido sinovial a IL-18 está aumentado em relação ao soro de doentes sob corticóides e o MTX diminui os seus níveis na articulação. Os nossos dados indicam que quando a doença está mais controlada (doentes sob MTX, anti-TNF ou tocilizumab) os níveis séricos de IL-18 sobem, levando-nos a especular sobre o efeito destas terapêuticas na produção desta citocina que poderá estar a actuar sistemicamente como anti-osteoclastogénica. Podemos ainda supor que o efeito da IL-18 estará dependente não só do balanço entre T_H1 e T_H17 mas também da sua acção sobre estas mesmas células.

Ao analisar os resultados da IL-10 no soro observamos que esta está diminuída nos doentes com AR sob anti-TNF ou tocilizumab. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória cujos níveis séricos surpreendentemente se correlacionam positivamente com a actividade da doença, provavelmente porque nos estados inflamatórios ocorre um aumento da produção desta citocina numa tentativa de contrariar o efeito da inflamação. Foi ainda observado que no líquido sinovial os níveis de IL-10 estão aumentados na articulação de doentes sob corticóides mas que em doentes sob MTX ou nos doentes com OA os níveis séricos e sinoviais são semelhantes, reforçando a hipótese apresentada.

O RANKL é uma molécula chave no processo de osteoclastogénese sendo de extrema importância na diferenciação de monócitos em osteoclastos. É produzido por osteoblastos mas também por várias células do sistema imunitário. Existem duas formas de RANKL, uma forma transmembranar expressa por células como linfócitos B e T, fibroblastos sinoviais, condrócitos, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos [69], e uma forma solúvel (sRANKL) produzida apenas por linfócitos T activados e clivada da forma transmembranar por acção da *TNF- α converting enzyme* (TACE) [70]. No soro o sRANKL está diminuído significativamente nos doentes sob anti-TNF e tem valores máximos nos doentes sob corticóides e nos doentes com OA. Quando observamos os doentes com AR constatamos que não existe correlação entre a actividade da doença e os níveis de sRANKL sugerindo que a terapêutica anti-TNF reduz os níveis circulantes de sRANKL por comparação às restantes terapêuticas estudadas.

A OPG é um receptor solúvel para o RANKL; esta molécula é produzida por osteoblastos, células dendríticas e linfócitos [71], actua impedindo a ligação RANK-RANKL e consequentemente inibe a osteoclastogénese. A razão sRANKL/OPG traduz o balanço dos estímulos pró e anti-osteoclastogénicos. Nos resultados obtidos a partir do soro observámos que esta razão está diminuída nos doentes sob anti-TNF (Resultados, figura 5.3) e é independente da actividade da doença (Resultados, figura 5.3). No líquido sinovial o sRANKL constitui uma pequena porção do RANKL total presente microambiente articular; desta forma, o cálculo da razão sRANKL/OPG não consideraria a expressão de RANKL por osteoblastos e pela maioria das células do sistema imune, pelo que não foi realizado.

A leptina e a adiponectina são adipocinas produzidas pelo tecido adiposo e têm uma acção sistémica. A leptina actua no hipotálamo mas também directamente sobre os precursores de osteoblastos aumentando a diferenciação dos mesmos. Alguns estudos demonstraram que a leptina inibe a diferenciação de osteoclastos *in vitro* [55] e que se correlaciona inversamente

com a actividade da doença e com a IL-6 [72]; por outro lado a leptina pode também activar linfócitos T, macrófagos e neutrófilos aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias com consequente potenciação da inflamação e do estímulo pró-osteoclastogénico [73]. Assim permanece controverso o papel da leptina no balanço remodelação/formação óssea e na sua associação com a AR. Os nossos resultados mostram que há uma tendência de relação inversa entre a leptina e a actividade da doença e com a IL-6 (excluindo os doentes sob tocilizumab pelas razões apresentadas anteriormente, dados não apresentados), no entanto existem muitos factores que podem interferir com esta relação. Na verdade, foi observado que os doentes com tocilizumab são os que têm os níveis séricos de leptina mais elevados, a par dos doentes sob corticóides e que os níveis articulares desta adipocina são muito reduzidos. Por sua vez a adiponectina induz a expressão de RANKL pelos OB e inibe a expressão de OPG, sendo por isso considerada pró-osteoclastogénica [74]. Os níveis de adiponectina articulares são mais baixos do que os séricos mas ainda está por confirmar se a sua acção é pró ou anti-inflamatória [75].

Acerca da comparação dos ambientes inflamatórios sistémicos e locais podemos tirar duas grandes conclusões. Em primeiro lugar observamos que os corticóides não controlam os níveis de citocinas a nível articular; em segundo lugar observámos que a terapêutica biológica (anti-TNF e tocilizumab) tende a exercer um melhor controlo sobre os níveis séricos de sRANKL e OPG do que apenas os corticóides ou o MTX. Ambas as observações são verdadeiras independentemente da actividade da doença.

O outro objectivo deste trabalho foi estudar o efeito das terapêuticas da AR na actividade dos osteoclastos. Não há consenso sobre quais as condições de cultura ideais para diferenciar monócitos de sangue periférico em osteoclastos. Em 2002, Holloway descreveu a formação de osteoclastos a partir de uma cultura de monócitos estimulados com M-CSF (25 ng/mL) e RANKL (40 ng/mL) durante 21 dias [55]. No mesmo ano, num outro estudo, foi descrita uma cultura de 14 dias estimulada com M-CSF (10 ng/mL), RANKL (30 ng/mL) e Dexametasona (10nM) [53]. Em 2003 um grupo de investigadores observou que adicionando à cultura M-CSF (20 ng/ml), RANKL (40 ng/ml), Dexametasona (1 nM) e TGF- β (2 ng/ml) o número de osteoclastos e a actividade da enzima TRAP era superior que adicionando apenas M-CSF e TGF- β à cultura [76].

Assim, os monócitos provenientes de diversos doentes sob diferentes terapêuticas foram colocados nas mesmas condições de cultura (sRANKL 60 ng/mL, M-CSF 25 ng/mL, TGF- β 2,5 ng/mL e dexametasona 1 μ M) por forma a garantir que se observassem diferenças estas

não seriam devidas ao método mas sim às células em si, condicionadas aos grupos de doentes avaliados. Esta aproximação colocou algumas dificuldades no controlo do número de células que aderem à placa de cultura, o que condiciona a densidade celular, factor essencial para a fusão dos monócitos. Um outro problema com que nos deparámos foi com a contaminação das culturas, facto imprevisível que levou à perda de alguns dados importantes neste estudo.

Apesar de estudos referirem que monócitos provenientes de sangue periférico de doentes com artrite psoriática, outra doença articular inflamatória crónica [77] em cultura durante 21 dias sem qualquer estímulo exógeno se diferenciam em OC, tal não foi observado nas nossas amostras de doentes com AR sob diversas terapêuticas. Na verdade, a coloração para TRAP, uma enzima expressa a partir da fase de pré-osteoclasto, dos monócitos apresentou-se sempre negativa (Resultados, figura 5.7). Mais ainda, não foi encontrado nenhum estudo em que se esta diferenciação ocorresse espontaneamente em doentes com AR, substanciando os resultados encontrados.

A avaliação da coloração TRAP ao fim de 21 dias de cultura permite-nos ter uma ideia da formação de OC; no entanto a contagem celular é feita manualmente e podendo haver falhas na observação de alguns núcleos que não estejam visíveis ou estejam sobrepostos (Resultados, figura 5.7). Assim para colmatar o erro associado a uma contagem manual avaliámos a expressão do gene codificante para a TRAP (*trap*) nos monócitos (d1) e nos OC ao fim dos 21 dias de cultura e observámos que os monócitos provenientes de doentes sob MTX têm maior expressão relativa de *trap* que os monócitos dos doentes sob anti-TNF e tocilizumab (Resultados, figura 5.8). No entanto, ao correlacionar a expressão relativa de *trap* nos monócitos com o estado inflamatório dos doentes observámos uma correlação positiva o que nos indica que o ambiente pró-inflamatório aumenta a predisposição destas células para a expressão de *trap* independentemente do efeito de fármaco. Quando comparamos a expressão de *trap* entre monócitos e OC observamos que a diferença é muito exacerbada nos OC de doentes sob MTX. Nos doentes sob biológico a expressão de *trap* é apenas ligeiramente mais elevada nos OC que nos monócitos. Mais ainda, correlacionámos algumas citocinas envolvidas na osteoclastogénese com a expressão de *trap* em monócitos e encontramos uma tendência que ilustra a associação entre o ambiente circulante e a expressão génica: quanto maiores os níveis circulantes de OPG (inibidor da osteoclastogénese), mais baixa a expressão relativa de *trap* (Resultados, figura 5.9). É de salientar que não foi encontrada qualquer correlação entre os níveis de OPG séricos e a actividade da doença.

No progresso da diferenciação dos monócitos em osteoclastos temos de seguida a expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$ uma das proteínas características do osteoclasto e essencial para a sua função e sobrevivência [78]. A integrina permite ao pré-OC polarizar num OC funcional através da sua ligação à osteopontina e sialoproteína da matriz óssea [12]. Neste trabalho foi pela primeira vez utilizada citometria de fluxo para avaliar a expressão da integrina $\alpha_v\beta_3$ em culturas de diferenciação de monócitos proveniente de doentes em osteoclastos. Mais ainda avaliámos a quantidade desta proteína à superfície celular através da intensidade média de fluorescência. Estes resultados (Resultados, figura 5.10) permitem-nos afirmar que, nestas condições de cultura, monócitos provenientes de doentes sob anti-TNF apresentam um atraso no pico de formação de OC. No entanto estes resultados têm de ser analisados tendo em conta que estamos a observar percentagem de células que expressam a integrina $\alpha_v\beta_3$ dentro de uma população de células gigantes multinucleadas e que a diminuição desta percentagem se pode dever a dois factores que não são mutuamente exclusivos. Por um lado as células podem morrer e por outro lado as células $\alpha_v\beta_3^+$ podem estar a fundir-se. Analisando a expressão de $\alpha_v\beta_3$ à superfície celular em conjunto com os resultados da percentagem de células podemos tentar inferir a fusão ou a morte celular. O aumento da intensidade média de fluorescência ao longo do tempo indica-nos potencialmente fusão celular; ao contrário, a sua diminuição pode indicar morte celular. Assim, analisando os painéis correspondentes aos doentes sob MTX temos que o número máximo de pré-OC e OC está formado ao dia 14 e que as células começam a morrer a partir desse dia havendo uma acentuada morte celular do 21º para o 25º dia. Nos doentes sob anti-TNF observamos, apesar do pico de células $\alpha_v\beta_3^+$ ao dia 21 e da acentuada descida no número de células dia 25, que a intensidade média de fluorescência se mantém o que pode indicar fusão de pré-OC e não morte celular. Nos doentes sob tocilizumab observamos que o número máximo de células $\alpha_v\beta_3^+$ é atingido ao dia 14 e que decresce a partir daí mas a intensidade média de fluorescência parece manter-se e decrescer um pouco no dia 25. Os doentes sob terapêutica biológica são os que têm menor expressão de integrina sendo que os doentes sob anti-TNF têm menos expressão transmembranar de $\alpha_v\beta_3$ do que os doentes sob tocilizumab (Resultados, figura 5.10, último painel). Assim sendo, os doentes sob terapêutica anti-TNF, talvez por serem os que têm o melhor controlo de actividade da doença, são os que tem o estímulo proteico menos favorável a osteoclastogénese.

Para aprofundar o estudo desta proteína avaliámos ainda a expressão da subunidade β_3 através do gene *intb3* (Resultados, figura 5.11) e o que observámos vai de encontro ao observado para a expressão de *tracp*. Para confirmar a relação entre a expressão génica e a

proteína à superfície correlacionámos a expressão relativa de *intb3* com a intensidade média de fluorescência (Resultados, figura 5.12); apesar de não haver correlação entre estas duas variáveis a associação entre elas é positiva confirmando os nossos dados.

A última proteína a ser expressa por um OC completamente diferenciado é a catepsina K (CTSK), uma enzima responsável pela degradação do colagénio do osso. Para avaliar a formação de OC funcionais através da actividade da CTSK realizaram-se ensaios de reabsorção ao 21º dia de cultura tendo-se observado formação de lacunas de reabsorção (Resultados, figura 5.13); no entanto este ensaio mede áreas de osso reabsorvido e é mais sensível estudar a CTSK através da expressão génica (Resultados, figura 5.14). Assim temos que mais uma vez a expressão do gene *ctsk* (apesar de ser basal) é mais elevada nos monócitos provenientes de doentes sob MTX e que nos doentes sob terapêutica biológica a expressão de *ctsk* parece estar mais regulada. Novamente, ao procurar uma correlação entre a expressão génica dos monócitos e a actividade da doença observámos um comportamento semelhante ao da expressão de *tracp* e *intb3*. Assim, e tomando estes resultados em conjunto podemos especular que o pequeno aumento basal de *tracp*, *intb3* e *ctsk* se devem ao ambiente pró-inflamatório circulante de onde os monócitos provêm.

Neste trabalho tivemos algumas limitações, nomeadamente o facto de termos uma amostra muito pequena e os grupos de doentes terem alguma heterogeneidade nas características da doença como actividade e duração da mesma, o que nos dificultou a interpretação dos resultados. Particularmente o grupo de doentes sob tocilizumab que estavam incluídos num ensaio clínico e tinham menos tempo de terapêutica do que os doentes dos outros grupos no entanto, todos os doentes com AR estavam estáveis há tempo suficiente para se poder afirmar que o controlo da actividade da doença se devia ao efeito terapêutico dos respectivos fármacos. Por outro lado, actualmente e com terapêuticas cada vez mais agressivas, não é possível colher líquido sinovial dos doentes sob terapêutica biológica impedindo a análise do seu perfil proteico na articulação. É ainda de notar a falta de uma condição basal de osteoclastos diferenciados de sangue de doentes com inflamação crónica e sem terapêutica e da caracterização da população de monócitos nos mesmos doentes.

Apesar das limitações do estudo os objectivos para este trabalho foram cumpridos sendo que as conclusões principais são que, independentemente da actividade da doença, os corticóides não interferem com os níveis de citocinas na articulação dos doentes com AR e que os doentes sob terapêutica biológica apresentavam melhor controlo do balanço pró-osteoclastogénico dado pela razão sRANKL/OPG.

Uma outra observação leva-nos a crer que, tal como descrito em diversas publicações [9], os doentes sob anti-TNF são aqueles que têm um ambiente menos propício à osteoclastogénese pois têm níveis séricos mais baixos de sRANKL, OPG e por consequência a razão sRANKL/OPG está também diminuída. Estes doentes, foram os que apresentaram um atraso no pico de formação de pré-OC e OC e onde a expressão de integrina $\alpha_v\beta_3$ à superfície foi mais baixa, independentemente da actividade da doença. Por outro lado, a expressão génica em monócitos mostrou-se positivamente correlacionada com a actividade da doença levando-nos a concluir que a expressão de genes que conduzem à diferenciação de monócitos em OC é influenciada pelo ambiente inflamatório.

Os resultados obtidos respondem aos objectivos propostos mas levantam outras questões que serão respondidas com estudos futuros, nomeadamente aumentando a amostra, estudando também as proteínas específicas expressas e a organização do citoesqueleto dos osteoclastos diferenciados a partir de sangue e líquido sinovial de doentes com AR.

7. Bibliografia

1. Theill, L.E., W.J. Boyle, and J.M. Penninger, *RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 795-823.
2. Robling, A.G., A.B. Castillo, and C.H. Turner, *Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 455-98.
3. Novack, D.V. and S.L. Teitelbaum, *The osteoclast: friend or foe?* Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 457-84.
4. Matsuo, K. and N. Irie, *Osteoclast-osteoblast communication*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 201-9.
5. Seeman, E. and P.D. Delmas, *Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility*. N Engl J Med, 2006. **354**(21): p. 2250-61.
6. Ducey, P., T. Schinke, and G. Karsenty, *The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1501-4.
7. J, C.L., C. H, and E.F. J, *Osteoimmunology--the hidden immune regulation of bone*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(3): p. 250-5.
8. Pettit, A.R., et al., *RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(9): p. 1068-76.
9. Schett, G., et al., *How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(10): p. 2936-48.
10. Del Fattore, A., A. Cappariello, and A. Teti, *Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis*. Bone, 2008. **42**(1): p. 19-29.
11. Takayanagi, H., *Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(4): p. 292-304.
12. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
13. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
14. Bar-Shavit, Z., *The osteoclast: a multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell*. J Cell Biochem, 2007. **102**(5): p. 1130-9.
15. Wu, Y., M.B. Humphrey, and M.C. Nakamura, *Osteoclasts - the innate immune cells of the bone*. Autoimmunity, 2008. **41**(3): p. 183-94.
16. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
17. Hofbauer, L.C., et al., *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and osteoprotegerin serum levels in psoriatic arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(10): p. 1218-22.
18. Yasuda, H., et al., *Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro*. Endocrinology, 1998. **139**(3): p. 1329-37.
19. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
20. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
21. Lipsky, P., *Rheumatoid arthritis*. , in *Harrison's principles of internal medicine*. 16th ed. 2005, McGraw-Hill: New York. p. 1968-77.
22. Lipsky, P.E., *Why does rheumatoid arthritis involve the joints?* N Engl J Med, 2007. **356**(23): p. 2419-20.
23. Schett, G., et al., *High-sensitivity C-reactive protein and risk of nontraumatic fractures in the Bruneck study*. Arch Intern Med, 2006. **166**(22): p. 2495-501.
24. Nose, M., et al., *Comparison of osteoclast precursors in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and osteoporosis patients*. J Bone Miner Metab, 2009. **27**(1): p. 57-65.
25. Udagawa, N., et al., *The molecular mechanism of osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2002. **4**(5): p. 281-9.
26. Teitelbaum, S.L., *Postmenopausal osteoporosis, T cells, and immune dysfunction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(48): p. 16711-2.
27. Nakashima, T. and H. Takayanagi, *Osteoclasts and the immune system*. J Bone Miner Metab, 2009.
28. Miranda-Carus, M.E., et al., *Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(4): p. 1151-64.
29. Fonseca, J.E., et al., *Inflammatory cell infiltrate and RANKL/OPG expression in rheumatoid synovium: comparison with other inflammatory arthropathies and correlation with outcome*. Clin Exp Rheumatol, 2005. **23**(2): p. 185-92.
30. Punzi, L., L. Calo, and M. Plebani, *Clinical significance of cytokine determination in synovial fluid*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2002. **39**(1): p. 63-88.
31. Fernandes, J.C., J. Martel-Pelletier, and J.P. Pelletier, *The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology*. Biorheology, 2002. **39**(1-2): p. 237-46.
32. Brennan, F.M., R.N. Maini, and M. Feldmann, *TNF alpha--a pivotal role in rheumatoid arthritis?* Br J Rheumatol, 1992. **31**(5): p. 293-8.
33. Kirwan, J.R. and A.S. Russell, *Systemic glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis--a debate*. Scand J Rheumatol, 1998. **27**(4): p. 247-51.
34. Dennison, E.M. and C. Cooper, *Corticosteroids in rheumatoid arthritis*. Bmj, 1998. **316**(7134): p. 789-90.
35. Klareskog, L., A.I. Catrina, and S. Paget, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2009. **373**(9664): p. 659-72.
36. Swierkot, J. and J. Szechinski, *Methotrexate in rheumatoid arthritis*. Pharmacol Rep, 2006. **58**(4): p. 473-92.
37. Feldmann, M., *Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 364-71.
38. Ackermann, C. and A. Kavanaugh, *Tumor necrosis factor as a therapeutic target of rheumatologic disease*. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(11): p. 1369-84.
39. Oldfield, V., S. Dhillon, and G.L. Plosker, *Tocilizumab: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis*. Drugs, 2009. **69**(5): p. 609-32.
40. Humira (adalimumab). 2008 [cited 2009; Available from: <http://www.rxabbott.com/pdf/humira.pdf>.
41. Medication Guide ENBREL® (en-brel) (etanercept). 2008 [cited 2009; Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2008/103795s5359lbl.pdf.
42. Seriola, B., et al., *[Are there any positive effects of TNF-alpha blockers on bone metabolism?]*. Reumatismo, 2006. **58**(3): p. 199-205.
43. Gengenbacher, M., et al., *Infliximab inhibits bone resorption by circulating osteoclast precursor cells in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(5): p. 620-4.

44. Chopin, F., et al., *Long-term effects of infliximab on bone and cartilage turnover markers in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(3): p. 353-7.
45. Yasunori, K., et al., *Reduction of urinary levels of pyridinoline and deoxypyridinoline and serum levels of soluble receptor activator of NF-kappaB ligand by etanercept in patients with rheumatoid arthritis*. Clin Rheumatol, 2008. **27**(9): p. 1093-101.
46. Hashimoto, J., et al., *A combination of biochemical markers of cartilage and bone turnover, radiographic damage and body mass index to predict the progression of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis treated with disease-modifying anti-rheumatic drugs*. Mod Rheumatol, 2009. **19**(3): p. 273-82.
47. Kato, A., et al., *Early effects of tocilizumab on bone and bone marrow lesions in a collagen-induced arthritis monkey model*. Exp Mol Pathol, 2008. **84**(3): p. 262-70.
48. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
49. Altman, R., et al., *The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip*. Arthritis Rheum, 1991. **34**(5): p. 505-14.
50. MedSystems., B. Bender MedSystems FlowCytomix™ Technology. 2007 [cited; Available from: <http://www.bendermedsystems.com/multiple-analyte-detection-flowcytomix--47>].
51. Shalhoub, V., et al., *Characterization of osteoclast precursors in human blood*. Br J Haematol, 2000. **111**(2): p. 501-12.
52. Husheem, M., et al., *Characterization of circulating human osteoclast progenitors: development of in vitro resorption assay*. Calcif Tissue Int, 2005. **76**(3): p. 222-30.
53. Hirayama, T., et al., *Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(11): p. 1232-9.
54. Breuil, V., et al., *Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(11): p. 1721-9.
55. Holloway, W.R., et al., *Leptin inhibits osteoclast generation*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(2): p. 200-9.
56. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.
57. Odilo Mueller, S.L., Andreas Schroeder, *RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control*. Agilent Publications, 2004.
58. Skaletsky, S.R.a.H.J., *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.*, in *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, M.S. Krawetz S, Editor. 2000, Humana Press: Totowa, NJ. p. pp 365-386.
59. Sato, K., *Th17 cells and rheumatoid arthritis--from the standpoint of osteoclast differentiation*. Allergol Int, 2008. **57**(2): p. 109-14.
60. Brennan, F.M., R.N. Maini, and M. Feldmann, *Role of pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis*. Springer Semin Immunopathol, 1998. **20**(1-2): p. 133-47.
61. Isomaki, P. and J. Punnonen, *Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis*. Ann Med, 1997. **29**(6): p. 499-507.
62. Weitzmann, M.N. and R. Pacifici, *Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1186-94.
63. Brennan, F.M. and I.B. McInnes, *Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3537-45.
64. Vergunst, C.E., et al., *Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(7): p. 1931-9.
65. Hounoki, H., et al., *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression*. Bone, 2008. **42**(4): p. 765-74.
66. Miyamoto, K., et al., *MCP-1 expressed by osteoclasts stimulates osteoclastogenesis in an autocrine/paracrine manner*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **383**(3): p. 373-7.
67. Patel, D.D., J.P. Zachariah, and L.P. Whichard, *CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium*. Clin Immunol, 2001. **98**(1): p. 39-45.
68. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 429-42.
69. O'Brien, C.A., *Control of RANKL gene expression*. Bone, 2009.
70. Hein, G.E., et al., *sRANKL and OPG in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in comparison to non-destructive chronic arthritis*. Rheumatol Int, 2008. **28**(8): p. 765-9.
71. Lewiecki, E.M., *Denosumab: an investigational drug for the management of postmenopausal osteoporosis*. Biologics, 2008. **2**(4): p. 645-53.
72. Popa, C., et al., *Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(8): p. 1195-8.
73. Aguilar-Chavez, E.A., et al., *Circulating leptin and bone mineral density in rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2009. **36**(3): p. 512-6.
74. Luo, X.H., et al., *Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway*. J Bone Miner Res, 2006. **21**(10): p. 1648-56.
75. Senolt, L., et al., *Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis*. Cytokine, 2006. **35**(5-6): p. 247-52.
76. Takuma, A., et al., *Dexamethasone enhances osteoclast formation synergistically with transforming growth factor-beta by stimulating the priming of osteoclast progenitors for differentiation into osteoclasts*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44667-74.
77. Ritchlin, C.T., et al., *Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis*. J Clin Invest, 2003. **111**(6): p. 821-31.
78. Zhao, H., F.P. Ross, and S.L. Teitelbaum, *Unoccupied alpha(v)beta3 integrin regulates osteoclast apoptosis by transmitting a positive death signal*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(3): p. 771-80.

Anexos

Quantificação de proteínas através do *FlowCytomix*TM

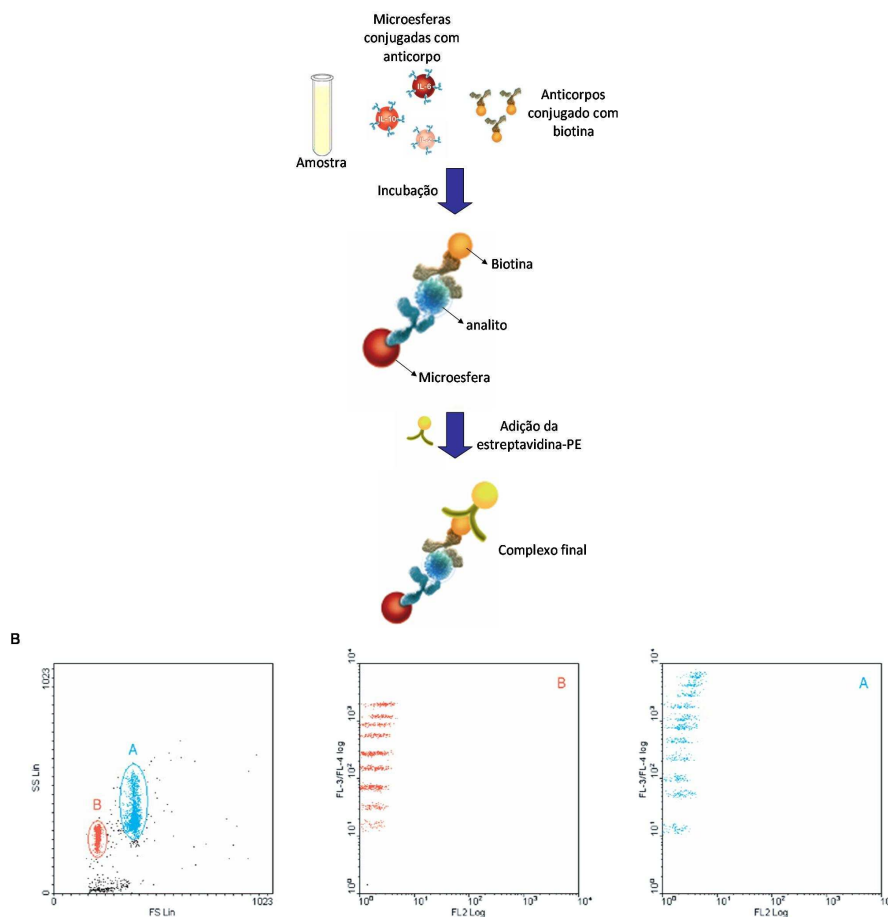


Fig. A.1 - A) Esquema do procedimento do *FlowCytomix*TM; B) Exemplo de separação das populações de microesferas pelas dimensões (primeiro painel) e das sub-populações por diferenças na intensidade de fluorescência (adaptado de 50).

O soro/líquido sinovial foi incubado com microesferas fluorescentes conjugadas com proteínas específicas para cada analito. De seguida foi adicionado um anticorpo conjugado com biotina que se liga aos analitos ligados às microesferas. Após incubação foi adicionada estreptavidina-PE que se liga aos conjugados de biotina. Por último as amostras foram lidas no FACS Calibur (BD Biosciences, E.U.A.). As microesferas têm tamanhos diferentes (4µm e 5µm) e cada população é constituída por sub-populações com diferentes intensidades de fluorescência que emitem a cerca de 690 nm (figura A.1). A estreptavidina-PE emite fluorescência a 578 nm e permite quantificar o analito.

Características dos primers e RT-PCR

- Conteúdo de Guanina-Citocina de cerca de 50%;
- 20 nucleótidos de comprimento;
- Temperatura de *melting* de 60°C, sendo que a temperatura dos dois *primers* não tenha mais de um grau Celsius de diferença;
- Sequência complementar dos *primers* presente na região exão-exão ou em exões diferentes;
- Dimensão máxima do transcrito de 200pb.

Tabela A.1 – Características dos *primers* usados no RT-PCR

Gene		Sequência	Ta	Transcrito
<i>ctsk</i>	Fw	GCCAGACAACAGATTTCATC	60°	75 pb
	Rv	CAGAGCAAAGCTCACCACAG		
<i>intb3</i>	Fw	GGGCAGTGTCATGTTGGTAG	60°	72 pb
	Rv	CAGCCCCAAAGAGGGATAAT		
<i>tracp</i>	Fw	CGGCCACGATCACAATCT	60°	89 pb
	Rv	GCTTTGAGGGGTCCATGA		
18s rRNA	Fw	GGAGTATGGTTGCAAAGCTGA	60°	129 pb
	Rv	ATCTGTCAATCCTGTCCGTGT		

Fw – *primer forward*; Rv – *primer reverse*; Ta – temperatura de emparelhamento dos primers; pb – pares de base

Tabela A.2 - Concentrações dos reagentes utilizados na reacção de qPCR

Concentração dos reagentes	
<i>DyNAmo Flash Mix</i>	1x
<i>Primers</i>	0,25µM
cDNA molde	1,8ng
H ₂ O	Até 20µL

Tabela A.3 - Condições do qPCR

Nº de Ciclos	Descrição	Temperatura	Tempo
1	Activação da enzima	50°C	2 min
1	Desnaturação inicial	95°C	7 min
50	Desnaturação	95°C	10 seg
	Emparelhamento dos primers/extensão	60°C	45 seg
	<i>Melting curve</i>	50-95°C	(1°C por patamar)

Quantificação génica pelo método da recta padrão

Neste método é construída uma curva a partir de cDNA de concentração conhecida. Esta curva (figura A.2) é então usada para extrapolar a concentração de genes alvo das amostras em estudo. Pela equação da recta padrão ($y = mx + b$, em que b é a ordenada na origem e m o declive da recta padrão) podemos retirar dados que nos permitem calcular a quantidade do gene alvo em amostras de concentração desconhecida. Desta forma, aplicando a equação

$$\text{Concentração_do_gene} = 10^{\frac{b-Ct}{m}}$$

conseguimos saber a quantidade de RNA. O resultado para os genes de interesse é de seguida normalizado com a quantidade do gene padrão 18s rRNA.

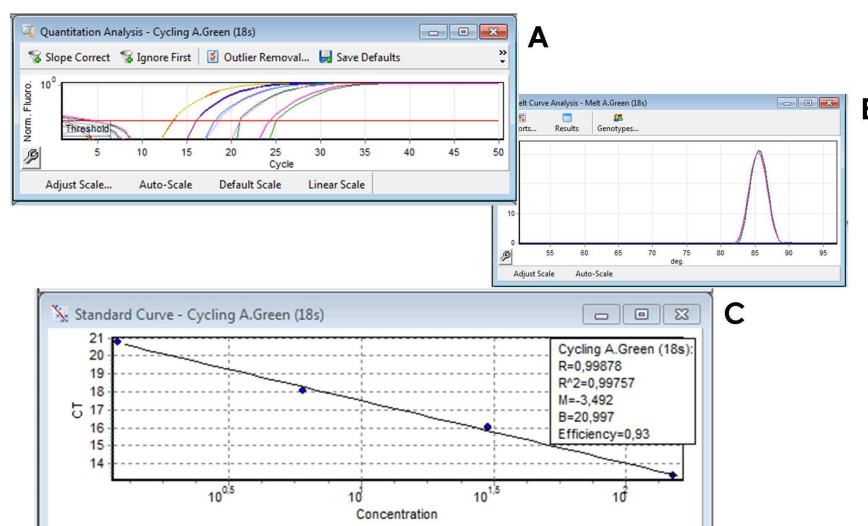


Fig. A.2 - Amplificação (A), *melting curve* (B) e recta padrão (C) para o gene referência rRNA 18s usando SYBR green. Pela análise da *melting curve* é observada a especificidade da reacção e na recta padrão a eficiência do qPCR é controlada.

Qualidade e integridade do RNA

As amostras de RNA extraídas de monócitos e de osteoclastos ao dia 21 de cultura apresentavam uma concentração média de 5,45 ng/μL sendo a razão das absorbâncias 260/280 nm de 1,89. A qualidade média das amostras indicada pelo *RIN* foi 8,57 (para um valor máximo de 10) e na figura A.3 podemos observar um exemplo do *output* do aparelho.

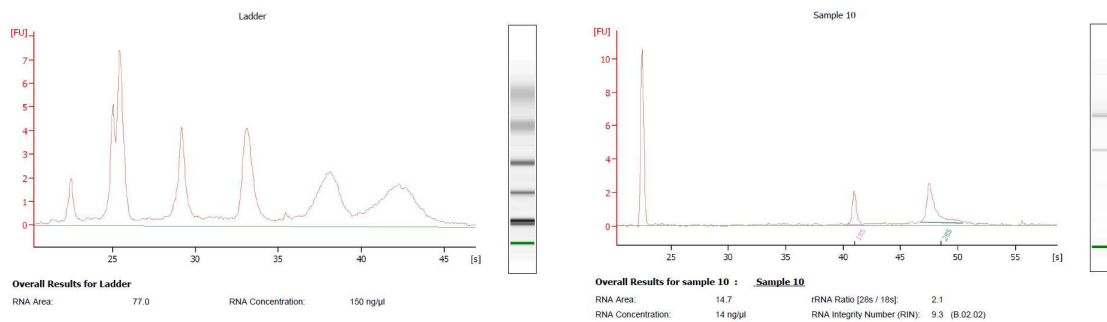


Fig. A.3 – *Output* do Agilent RNA 6000 Pico Kit obtido no Agilent 2100 Bioanalyser. No primeiro painel observamos o marcador molecular e no segundo painel o exemplo de um doente com AR sob anti-TNF.